

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL**

REGIANE REQUE

**AVALIAÇÃO DA ECOTOXICIDADE DE LOSARTANA POTÁSSICA EM
Astyanax altiparanae (lambari) ATRAVÉS DE ENSAIO COMETA E
BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS**

DISSERTAÇÃO

**CURITIBA
2017**

REGIANE REQUE

**AVALIAÇÃO DA ECOTOXICIDADE DE LOSARTANA POTÁSSICA EM
Astyanax altiparanae (lambari) ATRAVÉS DE ENSAIO COMETA E
BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Adriane Martins de Freitas
Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Wanessa Algarte
Ramsdorf
Coorientadora: Dr.^a Izonete Cristina Guiloski

**CURITIBA
2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

R124i
2016 Reque, Regiane
Avaliação da ecotoxicidade de losartana potássica em
Astyanax altiparanae (lambari) através de ensaio cometa e
biomarcadores bioquímicos / Regiane Reque.-- 2017.
86 f. : il. ; 30 cm

Texto em português com resumo em inglês
Disponível também via World Wide Web
Dissertação (Mestrado) – Universidade Tecnológica Federal
do Paraná. Programa de Pós-graduação em Ciência e
Tecnologia Ambiental, Curitiba, 2017
Bibliografia: f. 67-81

1. Acetilcolinesterase. 2. Glutathione. 3. Hipertensão – Efeito
das drogas. 4. Água – Poluição. 5. Água – Composição. 6.
Peixes – Contaminação. 7. Tecnologia ambiental – Dissertações.
I. Freitas, Adriane Martins de. II. Guiloski, Izonete Cristina. III.
Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-
graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental. IV. Título.

CDD: Ed. 22 – 363.7

Biblioteca Central da UTFPR, Câmpus Curitiba

TERMO DE APROVAÇÃO

Título da Dissertação nº 075

AVALIAÇÃO DA ECOTOXICIDADE DE LOSARTANA POTÁSSICA EM *Astyanax altiparanae* (LAMBARI) ATRAVÉS DE ENSAIO COMETA E BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS

Por

REGIANE REQUE

Dissertação apresentada às 13 horas do dia 23 de fevereiro de 2017, como requisito parcial para obtenção do título de MESTRE EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS, na área de concentração Tecnologias e Processos Ambientais, linha de pesquisa Controle e Monitoramento Ambiental, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Curitiba. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

Banca examinadora:

Prof^ª. Dr^ª. Adriane Martins de Freitas (Orientadora)
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental
Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR

Prof^ª. Dr^ª. Flávia Yoshie Yamamoto
Departamento Acadêmico de Química e Biologia
Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR

Prof. Dr. João Luiz Coelho Ribas
Universidade Positivo – UP

Visto da Coordenação:

Prof. Dr. Fernando Hermes Passig
Coordenador do PPGCTA

“A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Programa”

À minha “vó Dude” (in memoriam), por enxergar em mim a concretização de seu sonho.

AGRADECIMENTOS

Ao Poder Maior que existe em todas as coisas. Pelos milagres que possibilitaram e possibilitam a superação das minhas falsas limitações.

À Adri, por ser maravilhosa profissional e pessoalmente. Sou eternamente grata pela oportunidade de ingressar ao programa e poder trabalhar ao seu lado. Minha admiração por você só aumentou. Agradeço pelo incentivo, compreensão e ajuda sem limites, mesmo com o Bernardo a caminho - Obrigada, Be! Você colaborou muito!

Às coorientadoras Wan e Cris. À Prof Wan, pela instrução no trabalho com peixes e biomarcadores. Por sua disponibilidade, atenção e paciência, principalmente na fase inicial de minha pesquisa. À Cris, pelos sábios apontamentos durante minha qualificação e por, pronta e generosamente, aceitar me coorientar. Cris, não tenho como agradecer pelo enorme zelo que você teve ao me acompanhar e instruir. Sua contribuição foi essencial para concretização desse estudo. Adicionalmente, conhecer você, como pessoa, é um privilégio!

À Prof Lúcia, que, com seu notório e amplo conhecimento científico, fez valiosas sugestões ao trabalho, além de ter contribuído essencialmente com a realização das análises químicas. Agradeço muito também à Joicy, que colaborou com a realização das análises.

Aos amigos de lab: Moni (muitíssimo solicita desde que entrei na Ecotox), Eli, Ju, Yo e Rafa. Vocês me ajudaram muito, além de serem parceiros extra lab. À querida Rhai, pelo auxílio, pela amizade e por ser um exemplo de determinação. À Cami, pela ajuda, por todo café, risadas e cantorias - fundamentais nas horas mais difíceis. Ao Giovani, muito parceiro, que me ajudou imensamente e ensinou que cultivar lambari não é fácil - mas possível. Ao Vinícius, The OV, que no momento mais crítico do meu trabalho, foi demasiadamente prestativo e paciente - eu não teria conseguido sem você.

Às equipes de segurança, manutenção e limpeza da UTFPR. O trabalho e gentileza de vocês colaboraram muito com a realização desta pesquisa.

Ao Luís, pelas caronas, auxílio, compreensão, paciência, companhia, enfim. Por ser, simplesmente, o melhor amigo que alguém pode ter. À May, minha linda, pela amizade, apoio, conselhos e risadas. A todos meus amigos que apoiaram e que

me compreenderam durante a realização do mestrado, especialmente à Karla e à Pame.

Ao Vini, meu amor. Você surgiu no momento mais improvável e foi meu refúgio nessa fase tão complicada. Obrigada por ficar ao meu lado sempre.

À minha família, que me deu a oportunidade de chegar aonde cheguei. Por todo amor que recebi de vocês durante todos esses anos. Pelo apoio incondicional às minhas decisões. Sou extremamente grata e privilegiada por ter vocês comigo. E é claro, aos meus pequenos Vic e Juninho, minhas fontes de alegria.

Aos presentes na minha qualificação e defesa de mestrado, e a todos que de alguma forma contribuíram com a realização deste trabalho. A vocês, muito obrigada!

“A felicidade às vezes é uma bênção - mas geralmente é uma conquista”.

Paulo Coelho

RESUMO

REQUE, R. **Avaliação da ecotoxicidade de losartana potássica em *Astyanax altiparanae* (lambari) através de ensaio cometa e biomarcadores bioquímicos.** 2017. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2017.

Os anti-hipertensivos estão entre os fármacos mais consumidos no mundo e, por isso, frequentemente encontrados na natureza. Contudo, seus efeitos em organismos não-alvo ainda são desconhecidos. Nesta classe terapêutica, a losartana potássica é o principal representante consumido no Brasil. Estudos reportam concentrações consideráveis de losartana em ambientes aquáticos ($\mu\text{g L}^{-1}$) e em efluentes, em que já foi encontrada na faixa de mg L^{-1} . Desta maneira, investigações sobre os primeiros parâmetros de ecotoxicidade da losartana potássica são de grande importância biológica. Este estudo avaliou a influência da losartana sobre biomarcador genético e biomarcadores bioquímicos na espécie *Astyanax altiparanae* (lambari). Os experimentos foram divididos em duas etapas. Na Etapa 1, os indivíduos foram expostos à uma concentração fixa de losartana ($2,5 \text{ mg L}^{-1}$) em tempos de exposição de 6, 12, 24 e 48 h. O ensaio cometa demonstrou escores de danos de DNA reduzidos no tempo de exposição 12 h, o que pode sugerir um efeito protetivo. Para GSH e GST verificou-se, respectivamente, aumento da concentração e inibição da atividade enzimática, enquanto que a atividade de AChE não foi alterada. Na Etapa 2 foram analisados apenas biomarcadores bioquímicos. A losartana foi testada nas concentrações $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ e $2,5 \text{ mg L}^{-1}$ em tempo único de exposição (24 h). Nesta etapa, a atividade de AChE e a concentração de GSH não foram alteradas. Para GST, observou-se indução da atividade enzimática durante a exposição dos peixes ao fármaco na concentração $2,5 \text{ mg L}^{-1}$. A relação entre o tempo e os efeitos observados não pôde ser totalmente definida, mas foi verificado que os biomarcadores podem responder de maneira diferente de acordo com o tempo de exposição. A losartana não apresentou neurotoxicidade aos peixes, mas os resultados indicam possível estresse oxidativo.

Palavras-chave: Acetilcolinesterase. Glutathiona Reduzida. Glutathiona-S-transferase. Genotoxicidade. Fármaco. Peixes.

ABSTRACT

REQUE, R. **Evaluation of the ecotoxicity of losartan potassium in *Astyanax altiparanae* (lambari) by comet assay and biochemical biomarkers.** 2017. Dissertation (Master's Degree in Environmental Science and Technology) - Postgraduate Program in Environmental Science and Technology, Federal Technological University of Paraná. Curitiba, 2017.

Antihypertensives are among the most widely consumed drugs in the world and therefore often found in nature. However, their effects on non-target organisms are still unknown. In this therapeutic class, losartan potassium is the main agent consumed in Brazil. Studies have reported considerable concentrations of losartan in aquatic environments ($\mu\text{g L}^{-1}$) and in effluents, where it has already been found at mg L⁻¹ range. In this way, investigations on the first ecotoxic parameters of losartan potassium are of great biological importance. This study evaluated the influence of losartan on genetic biomarker and biochemical biomarkers in the species *Astyanax altiparanae* (lambari). The experiments were divided into two steps. In Step 1, subjects were exposed to a fixed concentration of losartan (2.5 mg L^{-1}) at exposure times of 6, 12, 24 and 48 h. The comet assay showed reduced DNA damage scores at the time of exposure for 12 h, which may suggest a protective effect. For GSH and GST, respectively, increased concentration and inhibition of enzyme activity was observed, whereas AChE activity was not altered. In Step 2 only biochemical biomarkers were analyzed. Losartan was tested at concentrations of 0.25 mg L^{-1} and 2.5 mg L^{-1} in single exposure time (24 h). At this stage, the AChE activity and the GSH concentration were not altered. For GST, induction of enzymatic activity was observed during the fish exposure at drug concentration of 2.5 mg L^{-1} . The relationship between time and observed effects could not be fully defined, but it was found that biomarkers may respond differently according to the time of exposure. Losartan did not show neurotoxicity to fish, but the results indicate possible oxidative stress.

Keywords: Acetylcholinesterase. Reduced glutathione. Glutathione-S-transferase. Genotoxicity. Drug. Fishes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - População X Consumo diário de unidades de medicamentos per capita.....	16
Quadro 1 - Classes de fármacos anti-hipertensivos	20
Figura 2 - Estrutura química da losartana potássica	21
Quadro 2 - Propriedades da losartana potássica.....	22
Figura 3 - Atuação dos antagonistas do receptor de angiotensina II.....	23
Quadro 3 - Concentrações de losartana potássica detectadas no meio ambiente e em estações de tratamento.....	24
Quadro 4 - Dados ecotoxicológicos da losartana potássica.....	26
Figura 4 - Célula em forma de cometa após ensaio. Quanto maior a cauda do cometa, maior é a migração do DNA e maior o dano sofrido.....	28
Figura 5 - Mecanismo da hidrólise da acetilcolina pela acetilcolinesterase.....	29
Figura 6 - Estrutura química da glutathione.....	31
Figura 7 - Atuação da GST e GSH no processo de desintoxicação celular.	32
Figura 8 - <i>Astyanax altiparanae</i>	34
Figura 9 - Fluxogramas das etapas do trabalho realizado.....	35
Figura 10 - Aclimação de <i>Astyanax altiparanae</i> em laboratório.	36
Figura 11 - Ensaio preliminar de toxicidade de losartana potássica à <i>Astyanax altiparanae</i>	37
Figura 12 - Ensaio definitivo. Exposição de <i>Astyanax altiparanae</i> à losartana potássica.....	40
Figura 13 - Coletas de sangue e tecidos dos peixes.....	41
Figura 14 - Etapas do ensaio cometa.	42
Figura 15 - Classificação de cometas quanto a dano genético observado.....	43
Figura 16 - Ensaio de exposição de <i>Astyanax altiparanae</i> à losartana potássica (Etapa 2).	47
Figura 17 - Experimentos A e B - Aspectos cromatográficos da losartana potássica.....	51
Figura 18 - Experimento C - Análise da degradabilidade da losartana potássica mediante diferentes condições de luminosidade e aeração.	51
Figura 19 - Experimento D - Análise da interferência da água de cultivo dos peixes sobre a concentração de losartana potássica.....	52
Figura 20 - Experimento E - Análise da interferência da presença dos peixes sobre a concentração de losartana potássica.....	53
Figura 21 - Escores de danos genéticos obtidos por ensaio cometa em eritrócitos de <i>Astyanax altiparanae</i> expostos à losartana potássica.....	54

Figura 22 - Atividade enzimática da acetilcolinesterase medida em cérebro e músculo de <i>Astyanax altiparanae</i> expostos à losartana potássica.....	56
Figura 23 - Concentração de glutathiona reduzida e atividade enzimática da glutathiona-S-transferase medidas em fígado de <i>Astyanax altiparanae</i> expostos à losartana potássica.	57
Figura 24 - Variação da concentração da losartana potássica nos aquários de concentração nominal = 0,25 mg L ⁻¹ (A) e 2,5 mg L ⁻¹ (B) ao longo do experimento de exposição (0-24h).....	61
Figura 25 - Atividade enzimática da acetilcolinesterase medida em cérebro e músculo de <i>Astyanax altiparanae</i> expostos à losartana potássica nas concentrações 0,25 e 2,5 mg L ⁻¹ por 24 horas.	62
Figura 26 - Concentração de glutathiona reduzida e atividade da glutathiona-S-transferase medida em fígado de <i>Astyanax altiparanae</i> expostos à losartana potássica nas concentrações 0,25 e 2,5 mg L ⁻¹ por 24 horas.	63

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	15
2.1 OBJETIVO GERAL	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3 REFERENCIAL TEÓRICO	16
3.1 FÁRMACOS NO AMBIENTE	16
3.2 LOSARTANA POTÁSSICA	20
3.3 ECOTOXICOLOGIA E TOXICIDADE	25
3.4 BIOMARCADORES	27
3.4.1 Biomarcadores Genéticos	27
3.4.1.1 Ensaio cometa.....	28
3.4.2 Biomarcadores Bioquímicos.....	29
3.4.2.1 Acetilcolinesterase (AChE).....	29
3.4.2.2 Glutaciona-S-transferase (GST).....	30
3.4.2.3 Glutaciona Reduzida (GSH).....	31
3.5 <i>Astyanax altiparanae</i> COMO ORGANISMO-TESTE	32
4 METODOLOGIA	35
4.1 ETAPA 1.....	36
4.1.1 Aclimação dos Organismos-Teste.....	36
4.1.2 Composto-Teste	37
4.1.3 Ensaio Preliminar	37
4.1.4 Análise da Estabilidade da Losartana Potássica.....	38
4.1.5 Bioensaio.....	39
4.1.6 Coleta e Preparo de Amostras Biológicas	40
4.1.7 Ensaio Cometa.....	42
4.1.8 Concentração de Proteínas Totais	44
4.1.9 Acetilcolinesterase (AChE).....	44
4.1.10 Glutaciona Reduzida (GSH).....	45
4.1.11 Glutaciona-S-transferase (GST).....	45
4.2 ETAPA 2.....	46
4.2.1 Aclimação dos Organismos-Teste.....	46
4.2.2 Bioensaio.....	46
4.2.4 Coleta e Preparo de Amostras	47
4.2.5 Concentração de Proteínas Totais	47

4.2.6 Acetilcolinesterase (AChE).....	48
4.2.7 Glutathiona Reduzida (GSH).....	48
4.2.8 Glutathiona-S-transferase (GST).....	48
4.2.9 Monitoramento da Cinética da Losartana Potássica	49
4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA	49
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
5.1 ETAPA 1.....	50
5.1.1 Ensaio Preliminar	50
5.1.2 Análise da Estabilidade da Losartana Potássica.....	50
5.1.3 Biomarcadores Bioquímicos e Genético.....	53
5.1.4 Ensaio cometa.....	54
5.1.5 Biomarcadores Bioquímicos.....	55
5.2 ETAPA 2.....	61
5.2.1 Monitoramento Cinético da Losartana Potássica	61
5.2.2 Biomarcadores Bioquímicos.....	62
6 CONCLUSÃO	66
REFERÊNCIAS.....	67
APÊNDICE A - Experimento D (Etapa 1) - Estabilidade Da Losartana Potássica Em Água De Tanque De Aclimação De Peixes	82
APÊNDICE B - Experimento E (Etapa 1) - Estabilidade Da Losartana Potássica Em Aquário Com Peixes	83
ANEXO A - Parecer CEUA.....	84

1 INTRODUÇÃO

Os corpos aquáticos são os principais meios de dispersão de contaminantes no ambiente, o que é justificado por suas propriedades de transporte de materiais e de interação com o ecossistema, além de sua utilização como receptores de efluentes diversos (GAFFNEY et al., 2014). Grande parte dos poluentes possuem impactos ainda não totalmente conhecidos. Estes poluentes são chamados contaminantes emergentes, termo atribuído não somente a compostos recentemente criados, mas também àqueles com utilização já consolidada e que ainda apresentam efeitos de contaminação pouco conhecidos (COSTA JUNIOR; PLETSCHE; TORRES, 2014; MOREIRA; GONÇALVES, 2011). Na natureza, esses compostos são encontrados em baixas concentrações, variando entre ng L^{-1} e $\mu\text{g L}^{-1}$ (SOUZA, 2012), o que implica na dificuldade de sua identificação e remoção. Com aplicações e composições variadas, os contaminantes emergentes são representados por grupos diversos, como fármacos, cosméticos, agrotóxicos, hormônios e produtos químicos industriais no geral (ABREU; BRANDÃO, 2013).

Apesar das baixas concentrações, como os demais contaminantes emergentes, os fármacos são introduzidos continuamente no ambiente, onde, portanto, têm presença constante, tornando-se uma preocupação ambiental (OLIVEIRA, 2013). As técnicas analíticas comuns são limitadas ao que se refere à detecção de compostos farmacêuticos em concentrações ambientais (YU et al., 2014), enquanto que as estações de tratamento de efluentes (ETEs) convencionais não são eficientes na remoção total desses compostos (BAUMANN et al., 2014; GONZÁLEZ-PLEITER et al., 2013; LI, 2014; YU et al., 2014). No tratamento convencional de efluentes, uma parte dos compostos farmacêuticos permanece na fase aquosa e pode atingir a coluna d'água, mesmo após as etapas de cloração ou irradiação ultravioleta (ANDRADE, 2014).

Santos et al. (2010) concluíram que os anti-hipertensivos estão entre as 10 classes de fármacos mais encontradas no ambiente aquático. Esses compostos são provenientes de efluentes farmacêuticos industriais, domésticos, hospitalares e também da disposição incorreta de medicamentos (GONZÁLEZ-PLEITER et al., 2013; TORRES et al., 2012). Os fármacos anti-hipertensivos são extensivamente utilizados em todo mundo, uma vez que, além de serem empregados no tratamento da hipertensão arterial sistêmica, contribuem com o controle de doenças

cardiovasculares (YAMAMOTO, 2014). No Brasil, o anti-hipertensivo mais consumido é a losartana potássica, sendo o fármaco mais vendido no país, entre todas as classes de fármacos, no ano de 2014 (Pereira et al., 2016).

Nos corpos aquáticos a losartana potássica tem sido encontrada majoritariamente na faixa de ng L^{-1} , como verificado por Bouissou-Schurtz et al., (2014), Huerta-Fontela et al. (2011), Oosterhuis, Sacher e Ter Laak (2013) e Santos et al. (2013). No Brasil, Pereira et al. (2016) detectaram concentrações de 11,8 a 32 ng L^{-1} de losartana em região costeira (PEREIRA et al, 2016). A maior concentração do fármaco no ambiente foi registrada na Índia, em um efluente de ETE que atende indústrias farmacêuticas: 2500 $\mu\text{g L}^{-1}$ (LARSSON; PEDRO; PAXEUS, 2007)

A legislação brasileira atual não estipula limites para a concentração ambiental de fármacos e outros contaminantes emergentes. Todavia, segundo a resolução Nº 430 do CONAMA (BRASIL, 2011a), efluentes lançados não devem ocasionar ecotoxicidade aos organismos aquáticos do corpo receptor. Tendo sido encontrada em corpos aquáticos, inclusive no Brasil, verifica-se a necessidade da avaliação ecotoxicológica da losartana potássica em organismos não-alvo.

Os biomarcadores bioquímicos e genéticos são respostas biológicas sensíveis para a avaliação de compostos presentes no meio ambiente em baixas concentrações. Os biomarcadores bioquímicos são assim denominados por indicarem efeitos de determinada substância através de alterações como induções e inibições enzimáticas (OLIVEIRA, 2014), enquanto que os biomarcadores genéticos evidenciam alterações no DNA ou RNA decorrentes de processos biológicos normais, de respostas terapêuticas ou exposições a xenobióticos (MARINI; BRANDI, 2009). Como organismos-testes, os peixes podem ser utilizados em ensaios com o uso de biomarcadores por apresentarem importância trófica e estarem expostos diretamente a contaminantes presentes nos corpos aquáticos. Além disso, possuem capacidade de acumulação de xenobióticos e sensibilidade aos contaminantes, mesmo que eles estejam em baixas concentrações (ARMILIATO, 2014).

Desta maneira, propôs-se neste estudo a avaliação ecotoxicológica da losartana potássica em *Astyanax altiparanae* (lambari), peixe integrante da fauna local, utilizando-se como ferramentas os biomarcadores bioquímicos e genéticos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a ecotoxicidade do anti-hipertensivo losartana potássica em *Astyanax altiparanae* (lambari), através de biomarcadores bioquímicos e genético.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a sensibilidade de *Astyanax altiparanae* (lambari) à losartana potássica, mediante exposição durante 24 h, por via hídrica, em sistema estático, em diferentes concentrações (0,25, 2,5 e 25 mg L⁻¹).
- Analisar a estabilidade química da losartana potássica ao longo do tempo, sob diferentes condições de luminosidade, aeração, presença de organismos-teste e matéria orgânica.
- Avaliar a ocorrência de alterações genéticas, neurotoxicidade e de estresse oxidativo em *Astyanax altiparanae* (lambari) após exposição à losartana potássica (2,5 mg L⁻¹), em diferentes tempos (0, 6, 12, 24 e 48 horas).
- Avaliar a ocorrência de neurotoxicidade e de estresse oxidativo em *Astyanax altiparanae* (lambari) após exposição à losartana potássica (0,25 e 2,5 mg L⁻¹), em tempo único de exposição (24 horas).
- Monitorar a estabilidade da losartana potássica em exposição por 24 horas na presença de peixes *Astyanax altiparanae*.
- Verificar a existência de relação entre o tempo de exposição e os efeitos nos biomarcadores bioquímicos e genético em *Astyanax altiparanae* (lambari) expostos à losartana potássica.

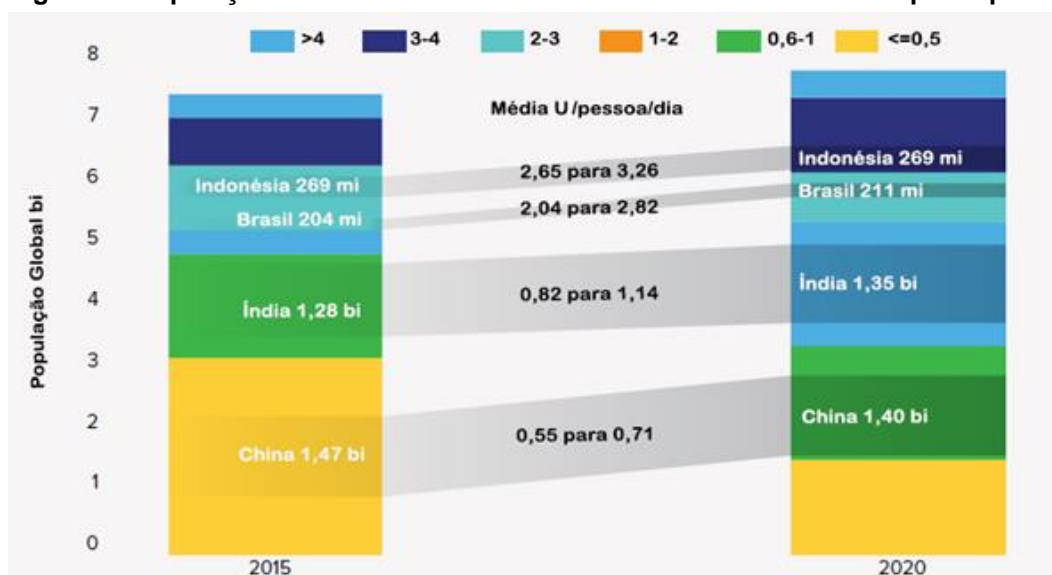
3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 FÁRMACOS NO AMBIENTE

Em 2015, o número de unidades de medicamentos consumidas foi de 3,63 trilhões, correspondendo a um custo aproximado de U\$ 1,07 trilhão. Em 2020, a previsão é que o consumo aumente em 24%, chegando a 4,5 trilhões de unidades e ao custo aproximado de US\$ 1,4 trilhão. Isso significa que em 2020, com uma população mundial estimada em 7,6 bilhões de pessoas, o uso de medicamentos *per capita* será de 1,6 unidades por dia (IMS Health, 2015).

Enquanto que países com mercado desenvolvido terão consumo mais estável, mercados emergentes, como Índia, China, Brasil e Indonésia, passarão a consumir significativamente mais (Figura 1). Esses países serão responsáveis por quase 50% do aumento da utilização mundial de medicamentos (IMS Health, 2015). O Brasil, em 2015, ocupou a sétima colocação no mercado farmacêutico internacional. Em 2020, a previsão é que ocupe o quinto lugar, atrás apenas dos Estados Unidos, China, Japão e Alemanha (IMS Health, 2015).

Figura 1 - População X Consumo diário de unidades de medicamentos per capita.



Legenda: (U) unidades de medicamentos.

Fonte: Adaptado de IMS Health (2015).

Mais de 600 substâncias farmacêuticas já foram detectadas no meio ambiente em todo o mundo (KÜSTER; ADLER, 2014). Os fármacos formam um

grupo de substâncias com propriedades químicas, estruturais, biológicas ou toxicológicas diversificadas (TAYLOR; SENAC, 2014). De modo geral, fatores como sua grande demanda, sua persistência no ambiente e suas propriedades físico-químicas e bioativas fazem com que os fármacos adquiram muita relevância enquanto contaminantes emergentes, principalmente quanto a possíveis impactos nos ambientes aquáticos (KÜSTER; ADLER, 2014; ZENKER et al. 2014).

A contaminação do ambiente por fármacos ocorre através de descargas industriais, destinação inadequada de produtos não utilizados ou vencidos, e, sobretudo, pela excreção dos usuários (TAYLOR; SENAC, 2014). Ao serem consumidos, os fármacos e seus metabólitos são liberados através das fezes, urina e plasma sanguíneo, podendo atingir matrizes ambientais como solos, corpos hídricos ou organismos livres (VICENTE, 2011). No tratamento convencional do esgoto doméstico ocorre degradação de apenas parte dos compostos farmacêuticos, permitindo que o restante possa atingir águas subterrâneas e superficiais (FERREIRA, 2011). Em ambientes aquáticos, os compostos estão sujeitos a alterações quantitativas, através de diluição, reconcentração ou transferência de fase, e qualitativas, através dos processos de degradação e de diversas reações químicas que podem modificar o seu potencial tóxico (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008).

Por meio da respiração, digestão ou contato com a epiderme, os poluentes tendem a ser absorvidos e retidos pelos organismos, sendo esta bioacumulação variável de acordo com a composição da substância e com as características tanto da exposição quanto da eliminação (OGA; CARMARGO; BATISTUZZO, 2008). Uma vez absorvidos, os compostos xenobióticos hidrofóbicos passam por processos bioquímicos de biotransformação, sendo alterados em compostos hidrossolúveis por ação de enzimas a fim de se facilitar sua excreção (CARVALHO et al., 2013; FRANCO; FRANCO, 2003).

Todavia, após a biotransformação, o potencial tóxico ou farmacológico da substância não é, necessariamente, reduzido, havendo a possibilidade de que os metabólitos sejam ainda mais tóxicos que o composto original (TRAVASSO, 2011). Esse processo ocorre tanto em seres mais simples como bactérias, quanto em seres mais complexos, como peixes e mamíferos. Nestes últimos, algumas enzimas envolvidas na biotransformação estão presentes em todo o organismo,

apresentando maior atividade em tecidos e órgãos, principalmente no fígado, e de acordo com o poluente, podem ser induzidas ou inibidas (AZEVEDO; CHASIN, 2004; FRANCO; FRANCO, 2003; OGA; CARMARGO; BATISTUZZO, 2008; OLIVEIRA, 2014). Na medida em que os poluentes são transferidos de um nível trófico a outro, através da cadeia alimentar, pode haver a biomagnificação dos compostos e aumento progressivo de sua concentração (GUIMARÃES, 2011).

Legislações específicas sobre o descarte de medicamentos ou sobre o monitoramento ambiental de fármacos são ainda incipientes. No Brasil, a destinação dos resíduos de saúde é abordada pela Resolução RDC Nº 306 da ANVISA (BRASIL, 2004), que dispõe sobre o Regulamento Técnico para o gerenciamento de resíduos de materiais serviços de saúde, e pela Resolução Nº 358 do CONAMA (BRASIL, 2005a), que dispõe sobre o tratamento e a disposição final dos resíduos dos serviços de saúde e dá outras providências. De acordo com essas resoluções, os serviços de saúde têm responsabilidade pelos resíduos que geram, incluindo sua destinação final. Todavia, não há uma legislação específica, em âmbito nacional, que regule a destinação de resíduos medicamentosos domiciliares (VELHO et al., 2016).

A Política Nacional de Resíduos Sólidos (PNRS), instituída pela Lei Nº 12.305 (BRASIL, 2010), prevê que agrotóxicos, pilhas, óleos lubrificantes, lâmpadas e produtos eletrônicos estejam sujeitos à logística reversa. Ou seja, depois de consumidos, esses produtos devem ser retornados a seu fornecedor, de modo com que o fabricante ou importador dê a destinação ambiental correta ao material. Esse instrumento, na PNRS, não é aplicado a medicamentos. Entretanto, está em tramitação um projeto de lei do Senado, o PLS 148/2011, que visa à alteração da Lei 12.305/2010 “a fim de incluir os medicamentos de uso humano ou de uso veterinário e embalagens no rol dos resíduos para os quais o sistema da logística reversa é obrigatório” (BRASIL, 2011b).

Em 2016, a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) publicou a ABNT NBR 16457:2016 para regulamentar os procedimentos de logística reversa de medicamentos de uso humano vencidos e/ou em desuso. A norma estabelece requisitos para os pontos de recebimento e suas responsabilidades, coleta interna e externa de medicamentos descartados pelo consumidor, segurança ocupacional das

partes envolvidas e para a reciclagem de bulas e embalagens secundárias (GARCIA, 2016).

Nos âmbitos estaduais e municipais, há algumas iniciativas que contemplam a logística reversa de medicamentos (VELHO, 2016). No Paraná, a Lei Nº 17.211 (PARANÁ, 2012) dispõe sobre a responsabilidade da destinação dos medicamentos em desuso e seus procedimentos. Segundo ela, a destinação adequada dos medicamentos é de responsabilidade de seus fabricantes, importadores, distribuidores e revendedores, estando os comerciantes ou distribuidores obrigados a aceitar a devolução de unidades usadas, vencidas ou inservíveis. Em complemento, o Decreto Nº 9213 (PARANÁ, 2013) estabelece as normas para a execução da Lei Nº 17.211, reforçando a obrigatoriedade da responsabilidade compartilhada da destinação dos resíduos.

Quanto ao monitoramento de fármacos no ambiente, as legislações são ainda mais deficientes. A Portaria Nº 2.914 (BRASIL, 2011c), as resoluções do CONAMA Nº 357 (BRASIL, 2005b) e Nº 430 (BRASIL, 2011a) não contemplam fármacos. Essas legislações são referentes, respectivamente a padrões de potabilidade da água, padrões de classificação de corpos de água e lançamento de efluentes. Elas abordam valores limites apenas em relação a parâmetros físico-químicos da água e a presença de metais, solventes, agrotóxicos e contaminantes microbiológicos (BOGER, 2015). A USEPA, Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, regula somente valores para resíduos como solventes, agrotóxicos, metais e materiais radioativos (BOGER, 2015; USEPA, 2013).

A União Europeia também não estabelece limites de concentração para resíduos farmacológicos em corpos de água, porém, já possui algumas diretrizes sobre o tema (BOGER, 2015). Para limitar a concentração de certas substâncias em águas superficiais, a Diretiva de Padrões de Qualidade Ambiental (EQSD) desenvolveu uma lista de vigilância (*Watch List*) para o monitoramento de substâncias potencialmente perigosas no meio aquático, incluindo alguns fármacos (EUROPEAN UNION, 2015). Segundo Lyons (2014), no que diz respeito à água potável, a legislação da União Europeia exige que os Estados-Membros tomem as medidas necessárias para garantir que a água destinada ao consumo humano esteja isenta de substâncias em concentrações que constituam um perigo potencial para a saúde humana, com ênfase no princípio da precaução. Contudo, na

legislação não existe qualquer exigência legal específica de monitorizar os níveis de produtos farmacêuticos na água potável (LYONS, 2014).

3.2 LOSARTANA POTÁSSICA

A hipertensão arterial sistêmica é caracterizada pela pressão arterial igual ou superior a 140 / 90 mmHg, para a população em geral (SBH, 2017), e é descrita como uma doença crônica, multifatorial, assintomática e de evolução gradativa. (DAMAS; NASCIMENTO; SOBRINHO, 2016; FONSECA, 2015; PIRES; FARIA; MODOLO, 2016). Atualmente, a hipertensão atinge aproximadamente um bilhão de pessoas no mundo e 30 milhões no Brasil, onde prevalece em 30% da população adulta (GIOLLO-JUNIOR et al., 2014; PIRES; FARIA; MODOLO, 2016;). A doença ocasiona alterações nos vasos sanguíneos e hipertrofia do ventrículo esquerdo, e é responsável por 25 % dos casos de insuficiência renal terminal, 40% dos infartos, 80 % dos acidentes vascular cerebral (Sociedade Brasileira de Hipertensão, 2008).

Os medicamentos anti-hipertensivos são classificados de acordo com seus locais ou mecanismos de ação (FEITOSA; BARBOSA, [2017?]). As classes disponíveis para uso clínico são apresentadas no quadro 1.

Quadro 1 - Classes de fármacos anti-hipertensivos

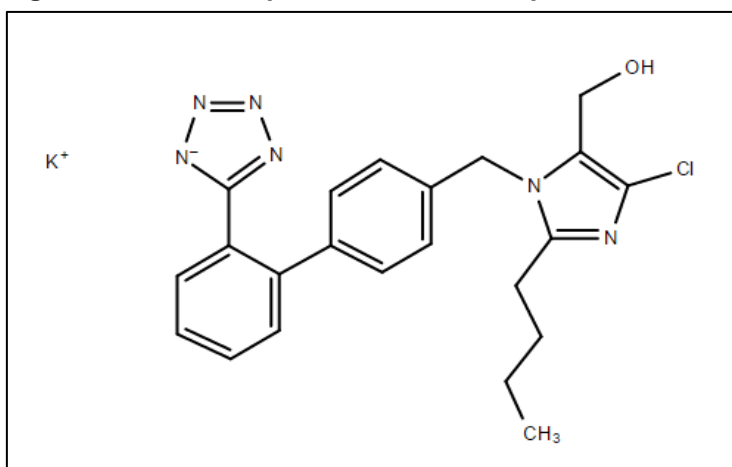
Diuréticos
Inibidores adrenérgicos
Ação central - antagonistas alfa-2 centrais
BB - Bloqueadores beta-adrenérgicos
Alfa bloqueadores - bloqueadores alfa-1 adrenérgicos
Vasodilatadores diretos
BCC - Bloqueadores dos canais de cálcio
IECA - Inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA)
BRA - Bloqueadores dos receptores AT ₁ da angiotensina II
Inibidor direto da renina

Fonte: Adaptado de 7ª Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial (2016).

O anti-hipertensivo mais utilizado no Brasil é a losartana potássica (Figura 2). Segundo Pereira et al. (2016) a losartana foi o fármaco mais vendido no Brasil em 2014, não apenas entre os anti-hipertensivos, mas entre todas as classes de

medicamentos. Em 2015, foi o quarto fármaco mais vendido e o que apresentou maior faturamento (ALVIM, 2016). Como medicamento de referência, a losartana potássica possui o Cozaar®, sendo disponibilizada na forma de comprimidos de 50 e 100 mg, além de adjuvantes (MERCK, 2015). Também está disponível em associação com o diurético hidroclorotiazida, com o nome comercial e de referência Hyzaar® (BRASIL, 2012; SATO, 2015).

Figura 2 - Estrutura química da losartana potássica



Fonte: A autora. Criado com PubChem Sketcher V2.4 (2017).

O Quadro 2 apresenta as principais propriedades físicas e químicas da losartana potássica.

Quadro 2 - Propriedades da losartana potássica.

Nome Químico ^a	Sal de potássio de 2-butil-4-cloro-1-[[2'-(2Htetrazol-5-il) [1,1'-bifenil]-4-il]metil]-1Himidazol-5-metanol
Nome Comercial ^e	Cozaar®
Sinônimos ^{a,b}	Losartan, Losartana
Fórmula Molecular ^a	C ₂₂ H ₂₃ ClN ₆ O. K
Peso molecular ^a	461,00 g mol ⁻¹
Número de registro no CAS ^a	124750-99-8
Aspecto ^b	Pó cristalino branco ou quase branco
Coef. partição octanol/água (Log Kow) ^b	3,01
pka ^a	4,9
Solubilidade em água ^a	Solúvel (3.300 mg L ⁻¹)
Solubilidade em etanol ^b	Solúvel
Volatilidade ^b	Não Volátil
Pressão de Vapor ^b	1,64 x 10 ⁻²⁶ mm Hg (a 25°C)
Ponto de Fusão ^b	183,5 – 184,5 °C
Coef. Adsorção em solo (Koc) ^b	5,69 x10 ⁵ L kg ⁻¹
Estabilidade ^c	Estável à hidrólise e biodegradação. Fotodegradável.
Meia-vida biológica ^d	Losartana potássica: 2 h. Metabólito: 6 - 9 h
Produtos do metabolismo humano ^b	Metabólito do ácido 5-carboxílico (EXP-3174)

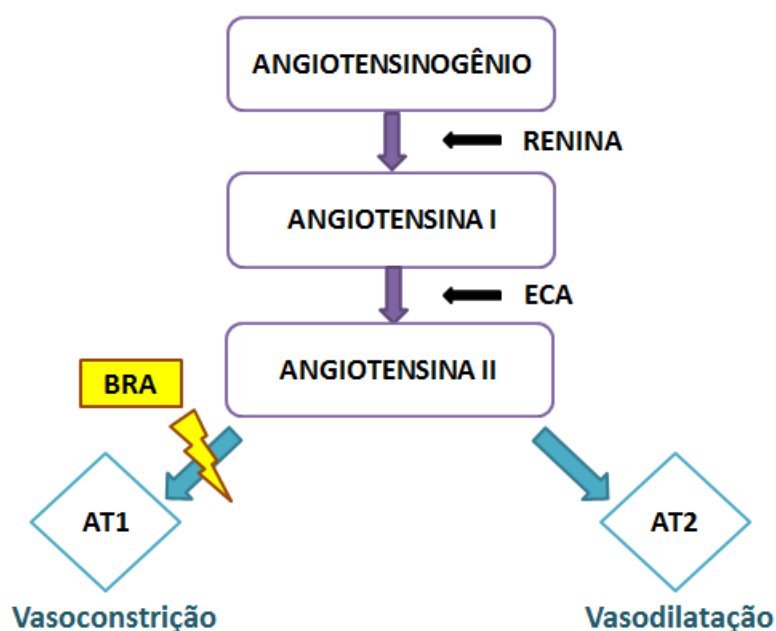
Fonte: ^a Godoy (2014); ^b Yamamoto (2014); ^c United States of America-FDA (2002); ^d Merck (2015); ^e MSD (2012).

Entre os anti-hipertensivos, a losartana potássica é classificada como um bloqueador dos receptores AT₁ da angiotensina II (BRA), sendo o primeiro da classe a ser descoberto e sintetizado (ARAUJO; CANTO; MOTHÉ, 2014; GODOY, 2014). A angiotensina II (Ang II) é um hormônio peptídico integrante do sistema renina-angiotensina (GOBO, 2014). Ao se ligar ao receptor AT₁, encontrado em tecidos

como o músculo liso vascular, glândulas adrenais, rins e coração, a Ang II ocasiona várias reações biológicas, incluindo a vasoconstrição (MERCK, 2015).

Antagonizando o receptor AT_1 (Figura 3), a losartana ocasiona o relaxamento do músculo liso e promove a vasodilatação, aumenta a excreção renal de sal e água, reduz a hipertrofia celular e o volume plasmático (HARDMAN et al., 1996). A ligação da losartana potássica é seletiva ao AT_1 e, portanto, não interage ou bloqueia outros receptores ou canais iônicos atuantes na regulação cardiovascular (MERCK, 2015).

Figura 3 - Atuação dos antagonistas do receptor de angiotensina II.



Legenda: (ECA): Enzima conversora da angiotensina; BRA: bloqueador dos receptores AT_1 da angiotensina II. No sistema renina-angiotensina, o angiotensinogênio é convertido pela renina em angiotensina I. Na sequência, a ECA converte a angiotensina I em angiotensina II. A angiotensina II pode se ligar à membrana celular através dos receptores AT_1 e AT_2 . Os BRA inibem a interação da angiotensina II ao AT_1 , de forma a reduzir a vasoconstrição e favorecer a vasodilatação.

Fonte: Adaptado de Peterson e Dunlap (2002).

Os comprimidos de losartana potássica possuem biodisponibilidade de aproximadamente 33%. Ao ser administrada por via intravenosa ou oral, 14% da dose de losartana é convertida em um metabólito ativo de ácido carboxílico (EXP-3174). Também há formação de metabólitos inativos, que incluem compostos formados por hidroxilação da cadeia lateral butílica e um glucuronídeo N-2 tetrazol. Tanto o fármaco quanto seus metabólitos possuem alta taxa de ligação (> 99%) às

proteínas plasmáticas. Quando administrada por via oral, 4% da dose de losartana é excretada na sua forma inalterada na urina, e 6% na forma de seu metabólito ativo (MERCK, 2015).

Dados referentes às concentrações de losartana potássica detectadas no meio ambiente são apresentados no Quadro 3.

Quadro 3 - Concentrações de losartana potássica detectadas no meio ambiente e em estações de tratamento.

ORIGEM	CONCENTRAÇÃO	LOCAL	FONTE
Água do mar (região costeira)	4 ng L ⁻¹	Espanha	Gros, Rodríguez-Mozaz e Barceló (2012)
Corpos Aquáticos	11 ng L ⁻¹	França	Bouissou-Schurtz et al. (2014)
Água do mar (região costeira)	11,8 a 32 ng L ⁻¹	Brasil	Pereira et al. (2016)
Efluente de Estação de Tratamento de Esgoto (ETE)	510 ng L ⁻¹	Espanha	Margot et al.(2013)
Efluente de ETE	90 ng L ⁻¹	Holanda	Oosterhuis, Sacher e ter Laak (2013)
Efluente de ETE	143 ng L ⁻¹	Portugal	Santos et al. (2013)
Afluente de ETE	237 ng L ⁻¹	Portugal	Santos et al. (2013)
Afluente de Estação de Tratamento de Água (ETA)	260 ng L ⁻¹	Espanha	Huerta-Fontela et al. (2011)
Afluente de ETE	790 ng L ⁻¹	Holanda	Oosterhuis, Sacher e ter Laak (2013)
Efluente de hospital universitário	910 ng L ⁻¹	Portugal	Santos et al. (2013)
Efluente de ETE de indústrias farmacêuticas	2,5 mg L ⁻¹	Índia	Larsson, Pedro e Paxeus (2007)

Fonte: A autora.

3.3 ECOTOXICOLOGIA E TOXICIDADE

A Ecotoxicologia é uma ciência relacionada ao estudo dos efeitos de substâncias químicas sobre os organismos (SCHÄFER et al.; 2013), desde o nível celular e enzimático até o de ecossistema (RONCO; BAÉZ; GRANADOS, 2004), a fim de compreender os mecanismos de ação desses agentes (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008) e permitir a mitigação, prevenção ou tratamento dos danos envolvidos (AZEVEDO; CHASIN, 2004; OGA; CARMARGO; BATISTUZZO, 2008). Olivi et al. (2008) indicam que a Ecotoxicologia é composta por uma sequência de etapas que compreende a emissão de contaminantes, destino e comportamento dos químicos e efeitos sobre a biosfera.

Em sistemas naturais ou em ensaios laboratoriais e de campo, a toxicidade pode se manifestar em diferentes maneiras, de acordo com o tempo de exposição do organismo ao contaminante. A toxicidade aguda é definida por Knie e Lopes (2004) como aquela em que os efeitos são imediatos e mais severos, com exposição do organismo ao agente nocivo por curtos períodos, associada, normalmente, ao colapso de tecidos e/ou sistemas fisiológicos. Em ambientes aquáticos, os estudos de toxicidade aguda envolvem, normalmente, a determinação de dose letal média (DL_{50}) ou concentração letal média (CL_{50}) (AZEVEDO; CHASIN, 2004).

A toxicidade crônica é relativa à exposição ao agente nocivo por períodos mais prolongados, comumente realizada durante as fases de vida mais sensíveis do organismo, normalmente nas fases iniciais de seu desenvolvimento (OLIVEIRA; AREND, GERBER; 2011). Ensaios de toxicidade crônica visam à determinação da concentração de efeito não observável (CENO), relativo à maior concentração da amostra em que não há efeito tóxico significativo sobre os organismos (AZEVEDO; CHASIN, 2004; GUIMARÃES, 2014).

Dados disponíveis na literatura referentes a estudos ecotoxicológicos com a losartana potássica são apresentados no Quadro 4.

Quadro 4 - Dados ecotoxicológicos da losartana potássica.

ORGANISMO	NOME POPULAR	EXPRESSÃO	CONCENTRAÇÃO (mg L ⁻¹)	FONTE
<i>Daphnia similis</i>	Pulga d'água	CE50	175,26	Yamamoto et al. (2012)
<i>Daphnia magna</i>	Pulga d'água	CL50	331	United States of America-FDA (2002)
<i>Lemna minor</i>	Lentilha d'água	CE50	63,9	Godoy (2014)
		CENO	0,78	
		CEO	1,56	
<i>Ceriodaphnia dubia</i>	Pulga d'água	CENO	10	Yamamoto et al. (2012)
		CEO	100	
<i>Pimephales promelas</i>	Peixe Vairão	CL50	1000	United States of America-FDA (2002)
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Truta-arco-íris	CL50	>929	United States of America-FDA (2002)
		CENO	>929	
<i>Lytechinus variegatus</i>	Ouriço do mar	CENO	50	Yamamoto et al. (2014)
		CEO	70	

Legenda: (CE50): Concentração que apresenta efeito em 50% dos organismos testados. (CL50): Concentração em que apresenta letalidade em 50% dos organismos testados. (CENO): concentração de efeito não observado. (CEO): Concentração de efeito observado.

Fonte: A autora.

Relacionando os Quadros 2 e 3, é possível verificar que as concentrações de losartana consideradas como tóxicas aos organismos nos testes conduzidos são, em sua maioria, significativamente superiores às concentrações detectadas em corpos aquáticos e estação de tratamento. Todavia, os dados disponíveis na literatura não contemplam informações ecotoxicológicas do efeito da losartana potássica sobre *Astyanax altiparanae*, e nem em biomarcadores genéticos e/ou bioquímicos.

3.4 BIOMARCADORES

Considerando a baixa concentração dos contaminantes emergentes nos sistemas aquáticos (Quadro 2), o efeito destes sobre os organismos pode se manifestar, por exemplo, como em alterações celulares e bioquímicas (GHELFI, 2014), implicando na necessidade de estudos que utilizem métodos suficientemente sensíveis (MATTOS, 2010), já que análises químicas não são capazes de prever os efeitos sobre os organismos. Neste contexto, as variáveis biológicas passíveis de mensuração têm sido amplamente utilizadas como biomarcadores, evidenciando os efeitos e a exposição ao poluente (GHELFI, 2014; JEBALI et al., 2012; OLIVEIRA, 2014). Segundo Peakall (1994) define-se biomarcadores como alterações biológicas que atuam em resposta à exposição a agentes externos, como contaminantes, e podem se manifestar desde o nível molecular até o de ecossistema.

3.4.1 Biomarcadores Genéticos

Através dos testes de genotoxicidade é possível verificar o potencial de agentes químicos, físicos ou biológicos em produzir danos ao material genético, incluindo alterações no DNA, como mutação, replicação anormal, quebras e anomalias mitóticas (SACRAMENTO, 2012). A toxicidade do composto pode ocasionar efeitos como câncer, teratogênese e embriotoxicidade, afetando, portanto, não só células, órgãos e indivíduo, mas também populações e comunidade (PAMPLONA, 2009).

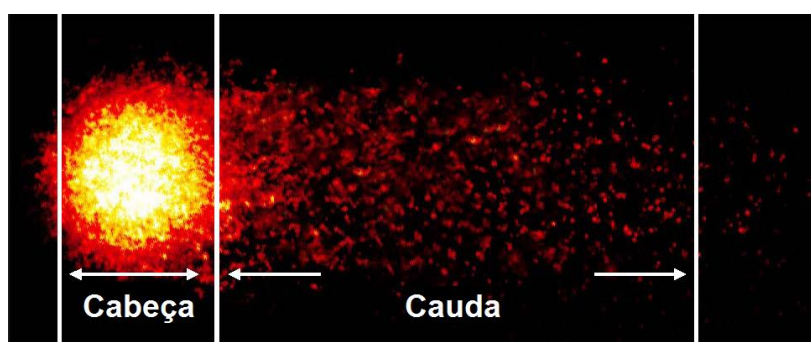
Naturalmente, danos ao DNA de animais são induzidos e reparados. Quando este equilíbrio é rompido, os danos genéticos podem ser observados e analisados (PAMPLONA, 2009). Como ferramentas para esta análise, os biomarcadores genéticos são utilizados, permitindo a avaliação dos efeitos da contaminação. Os biomarcadores genéticos mais utilizados são a frequência de aberrações cromossômicas e de trocas de cromátides irmãs, formação de adutos de DNA, anormalidades nucleares, frequência de micronúcleos e quebras no DNA (RAMSDORF, 2011).

3.4.1.1 Ensaio cometa

Como ferramenta para a determinação de genotoxicidade, o Ensaio Cometa é amplamente utilizado a fim de se verificar quebras na estrutura do DNA, podendo ser realizado *in vivo* ou *in vitro*. O método investiga danos ao DNA de células, analisando a migração do conteúdo nuclear em gel após aplicação de eletroforese (LAPUENTE et al., 2015; VENTURA et al., 2013).

A técnica de eletroforese em gel para detecção de danos ao DNA de uma única célula foi introduzida por Ostling e Johanson (1984). Posteriormente, Singh et al. (1988) utilizaram a mesma técnica em condições alcalinas ($\text{pH} > 13$), nomeando o teste como Ensaio Cometa (HUSSAIN, 2016). Segundo Ramsdorf (2011), o princípio da técnica é que o DNA não danificado da célula migra homoganeamente no gel, formando um círculo. Já o DNA danificado possui fragmentos diversos e, portanto, migra de forma heterogênea. Ao final da corrida eletroforética, observa-se que os fragmentos de DNA apresentam-se de forma semelhante à cauda de um cometa (Figura 4), o que justifica o nome do ensaio.

Figura 4 - Célula em forma de cometa após ensaio. Quanto maior a cauda do cometa, maior é a migração do DNA e maior o dano sofrido.



Fonte: Adaptado de Universität Würzburg (2016).

As vantagens em relação aos outros métodos de avaliação de genotoxicidade são atribuídas à sua alta sensibilidade para detectar danos ao DNA, à possibilidade de sua execução com pequeno número de células por amostra, e à sua versatilidade, já que pode ser aplicado a uma grande variedade de tipos celulares. Essas propriedades o tornam uma ferramenta particularmente adequada a estudos ecotoxicológicos (HUSSAIN, 2016; LAPUENTE et al., 2015).

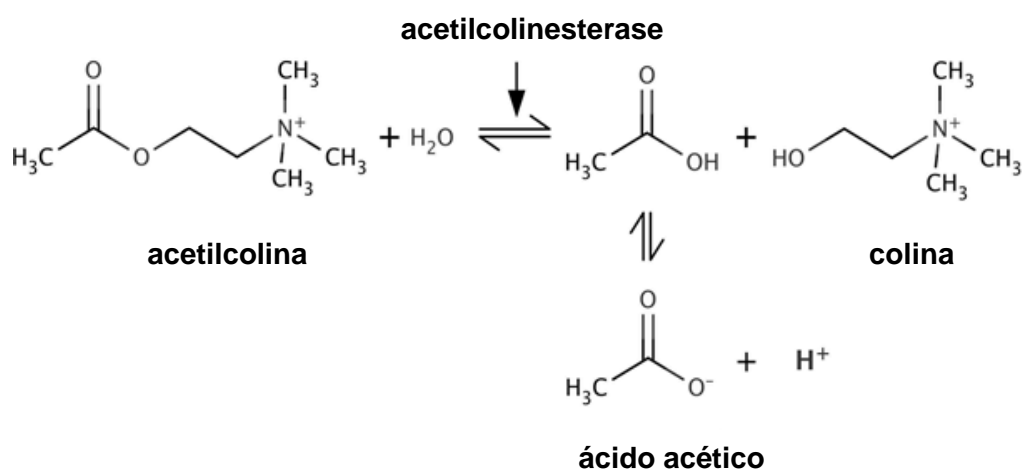
3.4.2 Biomarcadores Bioquímicos

Componentes dos sistemas bioquímicos podem ser utilizados como biomarcadores (ANDERSON, 2009). Os biomarcadores bioquímicos são, normalmente, mais sensíveis aos efeitos em biomarcadores de níveis mais altos de organização biológica (HUGGET et al., 1992).

3.4.2.1 Acetilcolinesterase (AChE)

A acetilcolinesterase (AChE) é um biomarcador de neurotoxicidade encontrado em junções neuromusculares e sinapses colinérgicas cerebrais (VANDEPUT et al., 2015). Sua função está relacionada à regulação da transmissão nervosa, promovendo a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina em ácido acético e colina (Figura 5) (BRAGA, 2013). Esta enzima pertence ao grupo das esterases, as quais catalisam a hidrólise de um éster, gerando álcool e ácido como metabólitos (MONTELLA; SCHAMA; VALLE, 2012). Entre as esterases, o grupo das colinesterases é responsável pela hidrólise de ésteres carboxílicos (TRAVASSO, 2011) que, além da acetilcolinesterase, também é integrado pela enzima butirilcolinesterase (BChE).

Figura 5 - Mecanismo da hidrólise da acetilcolina pela acetilcolinesterase.



Fonte: Fillafer e Scheiner (2014).

Os efeitos neurotóxicos devido à inibição da AChE podem se manifestar por paralisia muscular, convulsões, insuficiência respiratória e até morte, uma vez que a redução da enzima ocasiona acúmulo de acetilcolina e a hiperestimulação de receptores colinérgicos (OLIVERA, 2014; VANDEPUT et al., 2015). A AChE é normalmente utilizada como biomarcador de exposição a carbamatos e organofosforados, podendo ser também inibida por metais pesados, organoclorados e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) (JIANG et al, 2016; OROPESA; SANCHES; SOLER, 2017; RANI et al, 2017).

3.4.2.2 Glutathione-S-transferase (GST)

As enzimas envolvidas no processo de biotransformação são potenciais biomarcadores bioquímicos que agem sobre o metabolismo de Fase I e/ou Fase II (PAIXÃO et al, 2017). Essas fases ocorrem de forma independente. Durante a Fase I, reações de oxidação, redução e hidrólise originam grupos ativos -OH, -SH e -COOH por atuação das enzimas esterases, desidrogenases, oxidases e monooxigenases com subunidades de citocromo P-450 (CYP450) ou de flavinas (FMO). Na Fase II, que envolve reações de conjugação, o metabólito formado é conjugado por transferases a moléculas como glutathione, sulfatos, aminoácidos, acetilas e metilas (OGA; CARMARGO; BATISTUZZO, 2008; OLIVEIRA, 2014; BRAGA, 2013).

As GSTs são enzimas multifuncionais que constituem uma das principais superfamílias da Fase II e estão presentes tanto em organismos procarióticos quanto em eucarióticos como peixes e mamíferos, sendo nos eucarióticos encontradas principalmente no fígado (GRÖNER ZIKOVÁ; KLOAS, 2015; POLIMANTI et al., 2012). Além de atuar na formação de conjugados com GSH, participam do transporte intracelular, manutenção do balanço oxidativo, biossíntese de leucotrienos e prostaglandinas e controle da peroxidação lipídica (OGA; CARMARGO; BATISTUZZO, 2008; PAMPLONA, 2009).

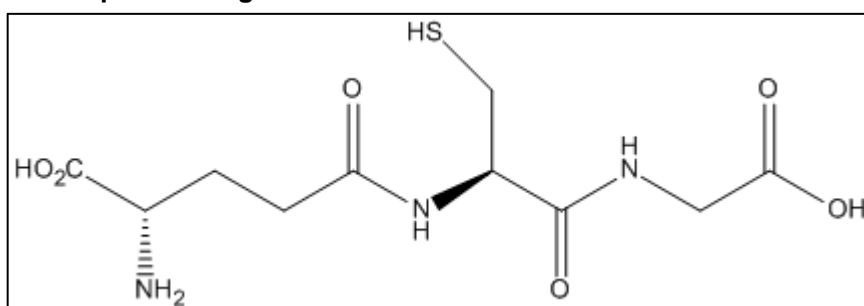
Na conjugação de compostos eletrofílicos à glutathione, sua ação ocorre em dois sítios ativos, um para ligação específica com GSH e outro para ligação com os compostos eletrofílicos (HUBER; ALMEIDA; FÁTIMA, 2008). Assim, as GSTs facilitam a excreção do contaminante e seus metabólitos, reduzindo a probabilidade

desses compostos se ligarem, por exemplo, ao DNA celular (MARTINEZ, [2006?]). Segundo Dixon, Laphorn e Edwards (2002), as GSTs atuam ainda na estabilização de metabólitos secundários como os flavonoides, reduzindo os hidroperóxidos a monohidróxi-álcool no processo de estresse oxidativo.

3.4.2.3 Glutathiona Reduzida (GSH)

A glutathiona é um tripeptídeo intracelular sintetizado pelo aminoácido cisteína, e se caracteriza por possuir um radical sulfidrila (Figura 6), que lhe confere capacidade antioxidante (GHELFI, 2014; GIUSTARINI et al., 2012; HUBER; ALMEIDA, 2008). Encontrada principalmente no tecido hepático, mantém estáveis os grupos tióis das proteínas e reduz ligações dissulfeto induzidas pelo estresse oxidativo, neutralizando radicais livres e eliminando o peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos orgânicos. É utilizada como indicador da homeostase celular (BERNO; POETA; MARÓSTICA-JÚNIOR, 2010, MARTINEZ, 2006).

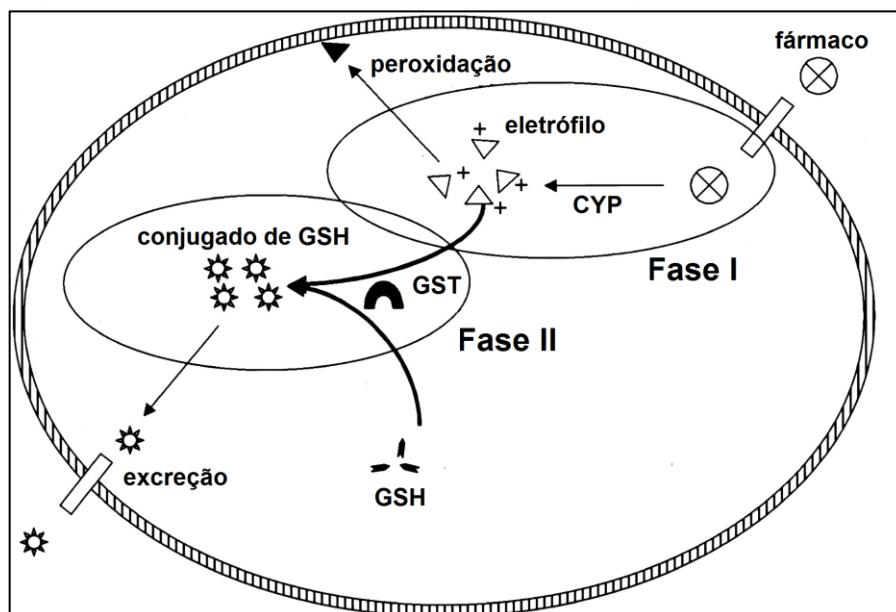
Figura 6 - Estrutura química da glutathiona.



Fonte: Helmenstine (2016)

Também é utilizada na síntese de proteínas e DNA e metabolização de xenobióticos (GHELFI, 2014; HUBER; ALMEIDA; FÁTIMA, 2008). Conforme a Figura 7, através da enzima glutathiona S-transferase (GST), a conjugação de GSH a compostos endógenos e exógenos possibilita a formação de substâncias mais hidrossolúveis e, conseqüentemente, mais facilmente excretáveis (GHELFI, 2014).

Figura 7 - Atuação da GST e GSH no processo de desintoxicação celular.



Legenda: O fármaco entra na célula e é metabolizado na Fase I pelo citocromo (CYP). Os produtos da Fase I são então metabolizados na Fase II, em que a GST neutraliza o eletrófilo e forma o conjugado com a GSH, o qual é excretado pela célula.

Fonte: Adaptado de Wu et al. (2004).

Paradoxalmente, Pompella et al. (2003) destacam que a GSH também participa de processos oxidativos, eventualmente levando à formação de espécies reativas de oxigênio e radicais livres. Sua multifuncionalidade é extremamente relevante às células. A deficiência de GSH pode ocasionar estresse oxidativo, um desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes que decorre da geração excessiva ou da menor taxa de remoção de radicais livres. Como consequência, o estresse oxidativo reduz a capacidade de desintoxicação celular, além de gerar o acúmulo das toxinas, comprometer a capacidade de reparo de DNA e reduzir a oferta de oxigênio e nutrientes para a célula, podendo, até mesmo, ocasionar morte celular (KLEIN; KLEIN, 2017).

3.5 *Astyanax altiparanae* COMO ORGANISMO-TESTE

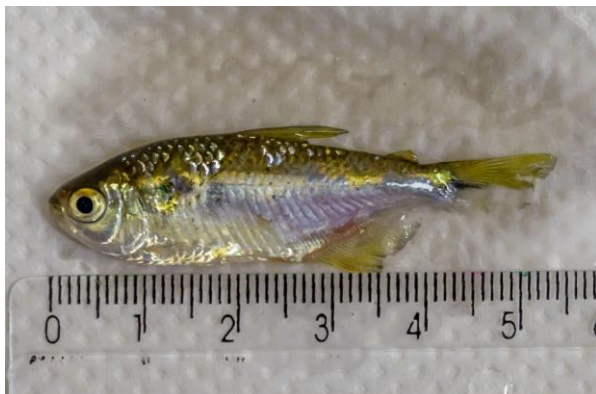
Os peixes possuem ampla distribuição geográfica, estão inseridos em diferentes níveis tróficos, (JESUS; CARVALHO, 2008) e constituem parte da alimentação humana (CASTRO et al, 2014). Essas características lhes conferem grande relevância como organismos-teste em estudos ecotoxicológicos. Em termos

laboratoriais, seu cultivo é facilitado por requerer equipamentos simples, comuns e financeiramente acessíveis (GOUVEIA; MAXIMINO; BRITO, 2006;). Além disso, nos experimentos em laboratório, usualmente são utilizados peixes de pequeno porte, o que possibilita a sua manutenção em ambientes reduzidos (GOUVEIA; MAXIMINO; BRITO, 2006) - desde que se atente à densidade dos organismos, que deve ser respeitada para sua sobrevivência e desenvolvimento (XISTER et al., 2014).

A família Characidae é composta por peixes ósseos e de água doce, que estão presentes no Texas, México, América Central e América do Sul (JAVONILLO et al., 2010). No Brasil, a subfamília Tetragonopterina é a que possui o maior número de indivíduos, sendo representada principalmente pelo gênero *Astyanax* (ALMEIDA, 2007). Proposto por Baird e Girard (1854), o gênero *Astyanax* atualmente possui 146 espécies válidas listadas por Froese e Pauly (2013). Conhecidas popularmente como piabas ou lambaris (FREITAS, 2011), as espécies apresentam muita similaridade morfológica, ecológica e comportamental (GARAVELLO; SAMPAIO, 2010; GURGEL, 2004) o que indica uma recente especiação (OSÓRIO, 2016). São caracterizadas por apresentarem corpo longo comprimido lateralmente, com comprimento entre 10 e 15 cm (MÉRONA et al., 2004), coloração principal prateada (DOMINGUES, 2005), nadadeira adiposa, linha lateral completa com leve curvatura, apresentando nadadeira caudal coberta com escamas apenas na base dos raios (SILVEIRA, 2014).

Anteriormente identificada como *Astyanax bimaculatus* (LINNAEUS, 1758), a espécie popularmente conhecida como lambari-do-rabo-amarelo ou tambiú (OSÓRIO, 2016) foi revisada e nomeada por Garutti e Britski (2000) como *Astyanax altiparanae*. Encontrado principalmente na bacia do rio Paraná, o *Astyanax altiparanae* (Figura 8) caracteriza-se pela coloração amarelada das nadadeiras (OSÓRIO, 2016), uma mancha preta horizontalmente ovalada e uma mancha preta em forma de losango no pedúnculo caudal (CAMARGO et al., 2016). A espécie atinge a maturidade sexual em quatro meses de idade e possui dimorfismo sexual, que é evidenciado no período reprodutivo pela aspereza da nadadeira anal dos machos (ALMEIDA, 2007). Quando maduros, os machos atingem de 7 a 12 cm de comprimento, enquanto que as fêmeas, 12 a 15 cm (CAMARGO et al., 2016).

Figura 8 - *Astyanax altiparanae*



Fonte: A autora (2016).

Os lambaris possuem hábitos diurnos e vivem em cardumes na região bentopelágica dos rios (ALMEIDA; COHEN, 2011). São onívoros, alimentando-se de componentes vegetais, insetos e invertebrados (MÉRONA et al., 2004; SILVEIRA, 2014). Além de impactarem as populações nativas por seu forte comportamento predador (ALMEIDA, 2007), são considerados de grande importância na dispersão de sementes de mata ciliar (SILVEIRA, 2014).

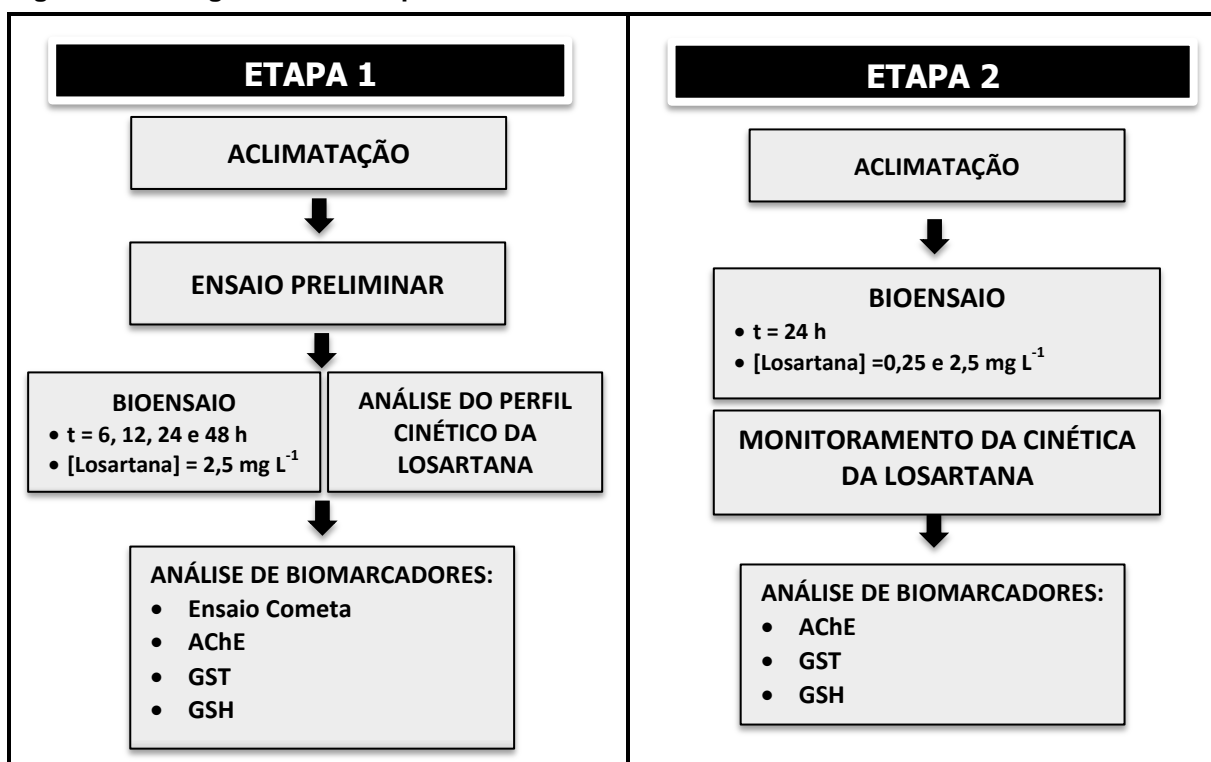
A utilização da espécie *Astyanax altiparanae*, integrante da fauna local brasileira, é reforçada pela necessidade, citada por Ramsdorf (2011), de se promover estudos com espécies endêmicas e assim promover a geração de novos dados ecotoxicológicos. Ramsdorf (2011) também enfatiza que esses organismos devam apresentar sensibilidade ao ensaio proposto, a fim de se identificar as respostas biológicas ao agente tóxico estudado. Em ensaios ecotoxicológicos utilizando biomarcadores, a espécie *Astyanax altiparanae* tem se mostrado sensível. Isso é evidenciado em estudos como os de Costa-Silva et al. (2015), que empregaram a espécie na análise de biomarcadores bioquímicos, e nos trabalhos de Freire et al. (2015) e Osório (2016), que realizaram análises de biomarcadores bioquímicos, genéticos, e histológicos.

4 METODOLOGIA

Os ensaios com peixes foram realizados após aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (CEUA/UTFPR), cujo parecer é apresentado no Anexo A.

O trabalho desenvolvido foi dividido em duas etapas (Figura 9). Os ensaios foram conduzidos com indivíduos da espécie *Astyanax altiparanae* em fase juvenil, não havendo distinção ou seleção de machos e fêmeas.

Figura 9 - Fluxogramas das etapas do trabalho realizado.



Na Etapa 1, os peixes foram aclimatados em laboratório, submetidos a um ensaio preliminar de toxicidade e ao bioensaio. Nesta etapa, foi testada uma concentração única de losartana potássica ($2,5 \text{ mg L}^{-1}$) em diferentes tempos de exposição (6, 12, 24 e 48h). Os biomarcadores analisados foram os bioquímicos AChE cerebral, AChE muscular, GST e GSH em fígado, e biomarcador genético (ensaio cometa) em sangue. Em paralelo ao bioensaio, experimentos para avaliação da cinética do fármaco foram conduzidos.

Na Etapa 2, após a aclimatação, os organismos foram submetidos diretamente a um bioensaio de exposição à losartana em duas concentrações

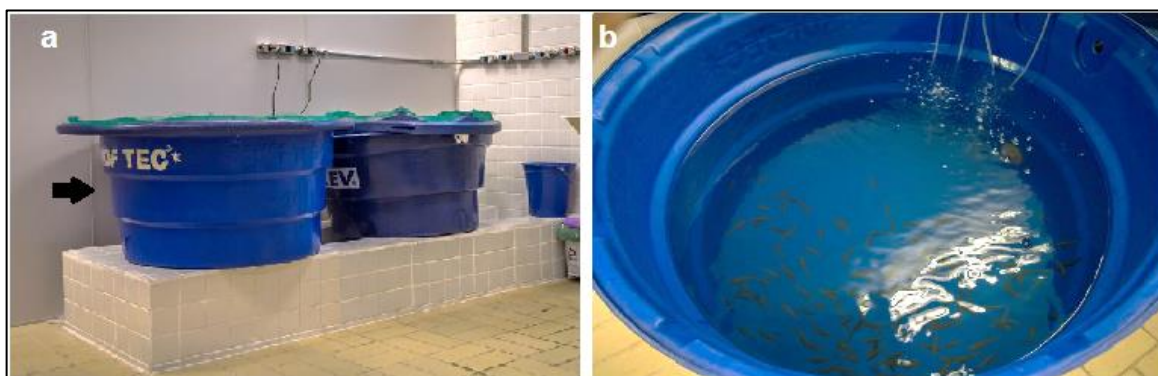
diferentes (0,25 e 2,5 mg L⁻¹) e em tempo único (24 h). Nesta etapa, foram analisados apenas os biomarcadores bioquímicos analisados na etapa anterior (AChE cerebral, AChE muscular, GST e GSH em fígado). O acompanhamento cinético do fármaco foi concomitante ao experimento.

4.1 ETAPA 1

4.1.1 Aclimação dos Organismos-Teste

Cento e cinquenta exemplares juvenis de *Astyanax altiparanae* foram adquiridos da Piscicultura Peixes e Peixes, Curitiba-PR, e aclimatados no laboratório em tanque (Figura 10) com 250 L de água filtrada e decolorada previamente por aeração. A aclimação ocorreu por um período de 40 dias, sob temperatura ambiente (25 ± 3 °C) e com fotoperíodo de 12 h. A oxigenação foi promovida por sistema aerador e o pH da água manteve-se em $7,10 \pm 0,81$, de acordo com o recomendado por Vilela e Hayashi (2001).

Figura 10 - Aclimação de *Astyanax altiparanae* em laboratório.



Legenda: (a) Disposição do tanque (em destaque) no laboratório. (b) Peixes durante a aclimação. Fonte: A autora (2016).

Diariamente, verificou-se a presença de partículas e sujidades passíveis de remoção que, quando presentes, foram removidas delicadamente com o auxílio de redes, de modo a minimizar o estresse dos peixes. A limpeza completa foi realizada a cada dois dias, através de sifonação concomitante ao reabastecimento de água filtrada, a fim de se manter o nível de água do tanque. A alimentação foi realizada diariamente com ração comercial em pellet contendo 25% de proteína (Kowalski) e,

complementarmente, com ração em flocos contendo 45% de proteína (Alcon Basic[®]).

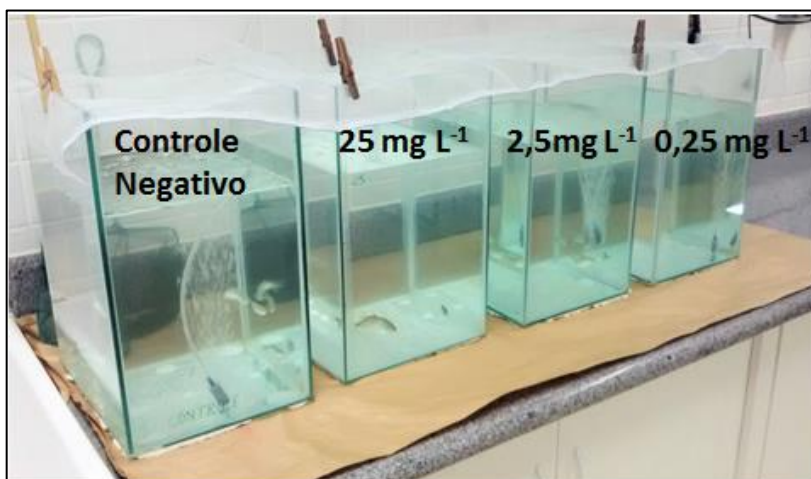
4.1.2 Composto-Teste

O composto utilizado para os ensaios foi o fármaco losartana potássica (Aurobindo Pharma, Índia, 99%). A concentração testada no ensaio definitivo foi estipulada em $2,5 \text{ mg L}^{-1}$, tendo-se por objetivo simular a concentração encontrada em efluentes de ETE na Índia (LARSSON; PEDRO; PAXEUS, 2007) e gerar dados sobre o efeito deste fármaco em biomarcadores de peixes. A fim de se excluir a possibilidade de morte dos peixes em decorrência à exposição ao fármaco nesta concentração, um ensaio de ecotoxicidade aguda preliminar foi desenvolvido.

4.1.3 Ensaio Preliminar

Considerando a inexistência de dados na literatura referentes à ecotoxicidade da losartana potássica à espécie *Astyanax altiparanae*, um ensaio preliminar foi conduzido (Figura 11), como base no método descrito por Knie e Lopes (2004).

Figura 11 - Ensaio preliminar de toxicidade de losartana potássica à *Astyanax altiparanae*.



Legenda: O aquário de controle negativo refere-se a grupos não exposto ao fármaco, enquanto que os demais foram expostos à losartana nas concentrações 25, 2,5 e $0,25 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente. Fonte: A autora (2016).

Foram testadas três concentrações de losartana potássica: 0,25, 2,5 e 25 mg L⁻¹, sendo 2,5 mg L⁻¹ a concentração pretendida para o ensaio definitivo. Para cada concentração, foram utilizados três peixes por aquário, com um volume final de 20 L. Os organismos foram expostos por 24h, com aeração moderada, temperatura 25 ± 3 °C e fotoperíodo de 12 h . Também foi utilizado um aquário como controle negativo, sem adição do fármaco. Tanto os organismos expostos à losartana, quanto os do grupo controle, foram alimentados até o dia que precedeu o ensaio.

4.1.4 Análise da Estabilidade da Losartana Potássica

A fim de avaliar a estabilidade da losartana potássica utilizada neste trabalho, foram realizados experimentos utilizando a mesma na concentração de 2,5 mg L⁻¹, sob diferentes condições, conforme descrição a seguir.

Experimento A: Solução preparada com água do tanque de cultivo de peixes filtrada em membrana de fibra de vidro (0,45µm) e com posterior adição de losartana.

Experimento B: Solução preparada com losartana adicionada em água do tanque de cultivo de peixes e posterior filtração em membrana de fibra de vidro (0,45µm).

Experimento C: Realizado com dois aquários “brancos” (sem peixes), com água filtrada, preparados da mesma maneira que os aquários do bioensaio. Um dos aquários foi mantido sob fotoperíodo de 12 h e aeração constante (“aquário claro”), enquanto que o outro foi mantido no escuro e não foi aerado (“aquário escuro”). Amostras foram coletadas nos tempos 0, 6, 12, 24 e 48 h e mantidas em freezer a -20 °C até análise.

Experimento D: Neste experimento, um aquário foi preparado com água coletada do tanque de cultivo de peixes, mas sem organismos-teste. Um segundo aquário foi preparado com água filtrada, sem organismos teste. Ambos os aquários foram mantidos sob fotoperíodo de 12 h e aeração constante. Amostras foram coletadas nos tempos 0, 6, 12, 24, 48, 72 e 96 h e armazenadas a 8°C até a análise.

Experimento E: Realizado com um aquário “branco” (sem peixes) e um aquário com 5 peixes, ambos sob fotoperíodo de 12 h e aeração constante. Amostras foram coletadas nos tempos 0, 6, 12, 24, 48, 72 e 96 h e armazenadas a 8°C até a análise.

As análises de losartana foram realizadas em cromatógrafo líquido modelo Prominence (Shimadzu) equipado com bomba quaternária (LC-20AT), degaseificador (DGU-20 A), autoinjeter (SIL-20 A), detector de arranjo de diodos (SPDM-20 A) e controladora (CBM-20 A), o sistema é operado por software LC Solutions. A coluna analítica utilizada (Hypersyl ODS, 150 x 46 mm d.i.) apresenta fase estacionária octadecilsílica (C18) com 5 µm de diâmetro de partícula,

O método analítico desenvolvido utilizou como fase móvel solução de ácido fosfórico 0,1% (v/v) e metanol grau HPLC (Sigma), com fluxo de 0,5 mL min⁻¹. A retenção da losartana foi ajustada com 63% de metanol em sistema isocrático, durante 15 minutos, após esse tempo foi programado gradiente de limpeza da coluna (63 a 90% de metanol) e retorno à condição inicial (63% de metanol, 10 min) antes de cada análise. O volume de injeção foi ajustado para 50 µL e o detector registrou as análises no intervalo de 190 a 450 nm.

Para a avaliação semi-quantitativa das concentrações de losartana, foi utilizado o método de fator de correção, a partir do valor médio da área correspondente à banda cromatográfica de interesse obtido a partir de réplicas de soluções preparadas em água de aquário. Esse valor médio foi dividido pela concentração nominal (2,5 mg L⁻¹) e, a partir do valor obtido, as demais concentrações foram estimadas pela mesma relação (Equação 1)

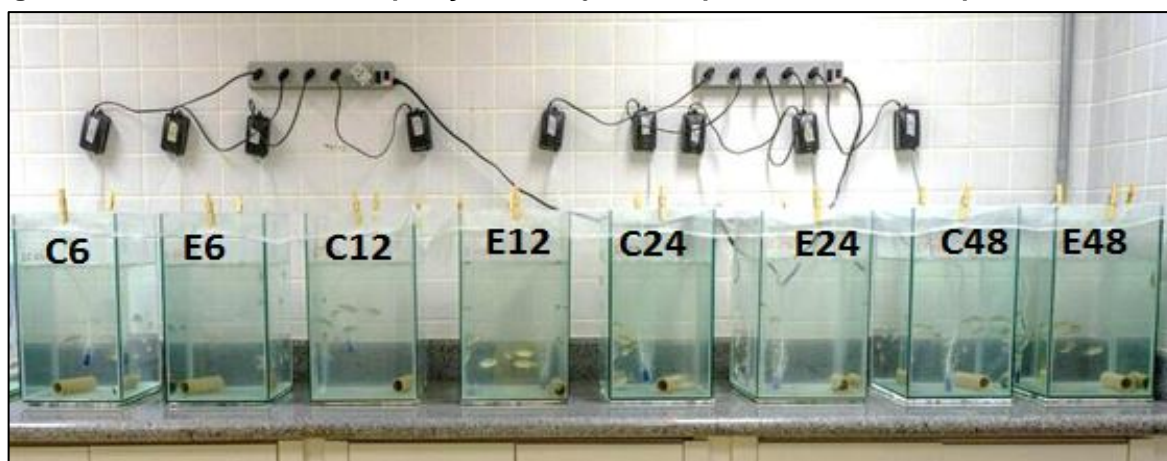
$$\text{Fator} = \frac{\text{área da banda (losartana)}}{\text{concentração}} \quad (1)$$

4.1.5 Bioensaio

O bioensaio foi desenvolvido nas mesmas condições da aclimação, com T = 25 ± 3 °C, fotoperíodo de 12 h e aeração constante. Os peixes (5,94 ± 0,54 cm; 2,87 ± 0,86 g) foram divididos em grupos de 10 indivíduos por aquário (20 L) e expostos à uma concentração única de losartana potássica durante diferentes tempos. A concentração utilizada foi de 2,5 mg L⁻¹ de losartana e as exposições

foram de 6, 12, 24 e 48 h. Para cada um dos tempos de exposição (grupos E6 - E48), havia um grupo de controle negativo (grupos C6-C48), conforme Figura 12. Os organismos foram alimentados até o dia precedente ao início do experimento, não recebendo alimentação durante o ensaio. O ensaio foi conduzido em sistema estático.

Figura 12 - Ensaio definitivo. Exposição de *Astyanax altiparanae* à losartana potássica.

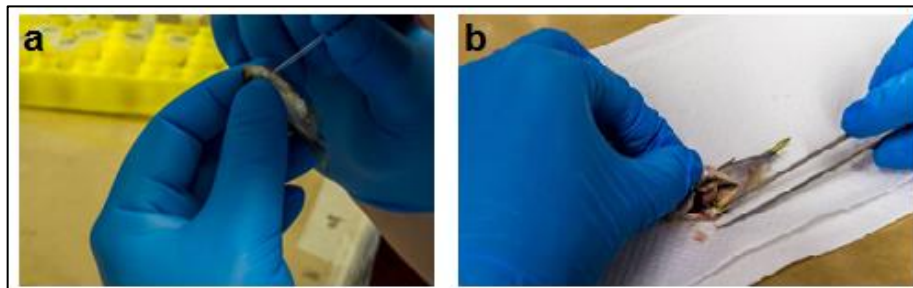


Legenda: (C) representa os grupos controle, enquanto que (E) indica os grupos expostos à losartana potássica na concentração única de $2,5 \text{ mg L}^{-1}$; (6), (12), (24) e (48) indicam o tempo de exposição em horas. Fonte: A autora (2016).

4.1.6 Coleta e Preparo de Amostras Biológicas

Depois de cada exposição, os peixes foram anestesiados em benzocaína 10% (Merck, via hídrica), eutanasiados por secção medular, pesados e medidos. Na sequência, foram coletados sangue, fígado, cérebro e músculo. O sangue foi coletado através de punção da veia caudal com capilar heparinizado e imediatamente adicionado a tubo de centrifugação contendo 1 mL de soro fetal bovino (FBS, Gibco). Os órgãos (cérebro, músculo e fígado) foram removidos com o auxílio de tesoura e pinça de ponta fina, e acondicionados em microtubos de microcentrifuga (tipo eppendorf). Todas as amostras foram mantidas refrigeradas em banho de gelo e, em seguida, levadas a ultrafreezer ($T = -70^\circ\text{C}$) (RAMSDORF, 2011). O sangue foi destinado à realização da análise do biomarcador genético através do ensaio cometa. Já os órgãos foram utilizados para análise dos biomarcadores bioquímicos.

Figura 13 - Coletas de sangue e tecidos dos peixes.



Legenda: (a) Coleta de sangue através de capilar heparinizado. (b) Remoção de fígado.

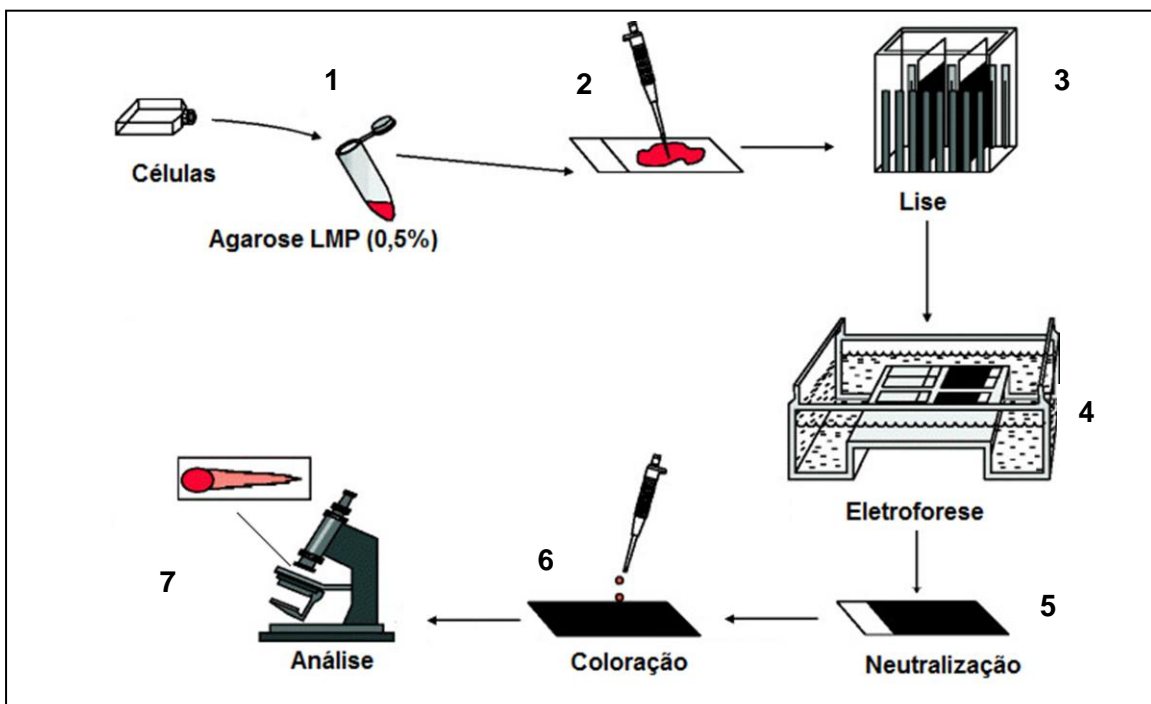
Fonte: A autora (2016).

As amostras de cérebro e músculo foram homogeneizadas em tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) em pH 7,5, na proporção 1:3 (m/v), enquanto que as amostras de fígado foram homogeneizadas em tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) em pH 6,5, na proporção 1:2 (m/v). A homogeneização ocorreu através de desagregador de tecidos do tipo ultra-turrax (Meclab). Na sequência, o material foi centrifugado a 10.000 g por 20 min a 4° C e o sobrenadante foi armazenado no ultrafreezer ($T = -70 \text{ }^\circ \text{C}$) (RAMSDORF, 2011). Depois das amostras terem sido homogeneizadas, as análises dos biomarcadores bioquímicos foram realizadas em triplicata, em microplacas de 96 poços e a leitura foi realizada em leitor de microplacas marca BMG Labtech, modelo FluoStar Omega.

4.1.7 Ensaio Cometa

O ensaio cometa foi realizado de acordo com metodologia descrita por Speit e Hartmann (1999), demonstrada no esquema apresentado na Figura 14.

Figura 14 - Etapas do ensaio cometa.



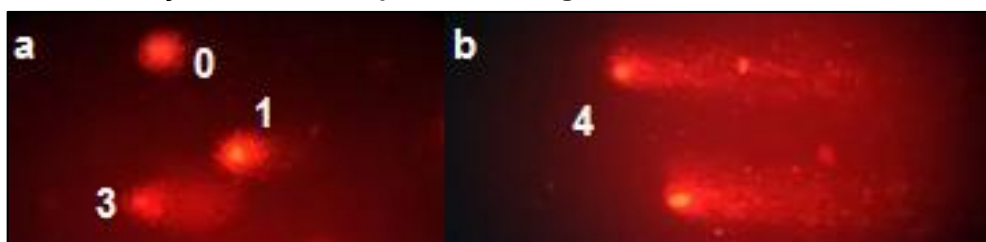
Fonte: Adaptado de Speit e Hartmann (2006).

Conforme Figura 14, depois da coleta do sangue e sua diluição em FBS (soro fetal bovino), 10 μL do diluído foi adicionado a 120 μL de agarose de baixo ponto de fusão (LMA) (1) e aplicado sobre a superfície de uma lâmina coberta com agarose normal (2). As lâminas foram então posicionadas em cubetas (3) e imersas em solução de lise (Triton X100 1%; DMSO 10%; Solução com NaCl 2,5 mol L^{-1} , EDTA 100 mmol L^{-1} , Tris 10 mmol L^{-1} , NaOH 0,8 %, N-laurilsarcosinato 1%) por 6 dias, sob 4 $^{\circ}\text{C}$. Em cuba horizontal (4), as lâminas foram posicionadas e imersas em tampão de eletroforese alcalino de pH 13 (NaOH 300 mmol L^{-1} ; EDTA 200 mmol L^{-1}) por 25 min, a fim de promover a desnaturação do DNA. Na sequência, foi aplicada a eletroforese (300mA, 25V) por mais 25 min. As lâminas foram retiradas da cuba e neutralizadas (5) com solução Tris 0,4 mol L^{-1} (pH 7,5) e fixadas com etanol 92%. Brometo de etídio (10 $\mu\text{g mL}^{-1}$) foi adicionado a cada lâmina (6), no

volume de 20 μL , para coloração do material. As lâminas foram analisadas em microscópio de epifluorescência (Leica), em magnificação de 640 vezes (7). Todo o procedimento descrito foi desenvolvido no escuro.

Os primeiros cem nucleóides de cada lâmina foram quantificados e classificados de acordo com a intensidade de dano sofrido no DNA, classificados como de dano 0 (sem dano) a dano 4 (dano máximo) (Figura 15).

Figura 15 - Classificação de cometas quanto a dano genético observado.



Legenda: Classificação de 0 a 4, de acordo com o dano sofrido. Quanto maior a cauda, maior a intensidade do dano. Cometas observados em microscópio de epifluorescência (Leica), em magnificação de 640 vezes.

Fonte: A autora (2016).

Para cada peixe foi atribuído um escore de dano genético, conforme Equação 2. Para cada grupo de peixes, calculou-se a mediana dos escores.

$$Escore = (0 \times n0) + (1 \times n1) + (2 \times n2) + (3 \times n3) + (4 \times n4) \quad (2)$$

Em que:

$n0$ = número de nucleóides classificados como classe 0

$n1$ = número de nucleóides classificados como classe 1

$n2$ = número de nucleóides classificados como classe 2

$n3$ = número de nucleóides classificados como classe 3

$n4$ = número de nucleóides classificados como classe 4

4.1.8 Concentração de Proteínas Totais

A concentração de proteínas totais foi determinada para as amostras de fígado, músculo e cérebro, separadamente. O procedimento foi baseado na metodologia de Bradford (1976). Na microplaca, 10 μL do sobrenadante e 250 μL de reativo de Bradford (Sigma-Aldrich) foram adicionados em cada poço. Como referência para a concentração de proteína, uma curva padrão com soro de albumina bovina (BSA) foi desenvolvida com as concentrações 0, 62,25, 125, 250 e 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Para a curva, também se utilizou volume 10 μL de BSA para 250 μL de reativo de Bradford. A absorbância foi mensurada a 595 nm.

A concentração de proteínas totais obtida por tecido foi utilizada para se normalizar a concentração de proteínas em cada análise de biomarcador bioquímico, conforme equações apresentadas na sequência.

4.1.9 Acetilcolinesterase (AChE)

A atividade de AChE em cérebro e músculo foi determinada a partir do método de Ellman et al. (1961), adaptado para microplaca por Silva de Assis (1998).

O ensaio consistiu em, inicialmente, diluir o sobrenadante em tampão fosfato (0,1 mol L^{-1}) em pH 7,5, na proporção 1:10. Em cada poço da microplaca foram adicionados 50 μL da amostra diluída, 200 μL do reagente DTNB (5,5-ditio-bis-2 nitrobenzoato, Sigma-Aldrich) a 0,75 mM e 50 μL do substrato ATC (iodeto de acetiltiocolina, Sigma-Aldrich) a 9 mM. A absorbância foi medida a 405 nm durante 4 min, a cada 30 s.

$$\text{Ativ. AChE} = \frac{(\Delta\text{Abs.min}^{-1} \times 1000) \div (d \cdot \epsilon) \times \text{diluição do tecido}}{[\text{Proteínas Totais}] \div (V_{\text{total no poço}} \div V_{\text{de amostra no poço}})} \quad (3)$$

Em que:

Ativ. AChE = atividade de AChE em $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteínas}^{-1}$

V = Volume

$\Delta\text{Abs.min}^{-1}$ = variação da absorbância em 1 min.

d = caminho óptico percorrido pelo feixe de luz ($v_{\text{poço}} = 300 \mu\text{L}$) = 0,9 cm

ϵ = absorvidade molar = 13,6 $\text{mmol L}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

[Proteínas Totais] = concentração de proteínas em mg.mL^{-1}

4.1.10 Glutathiona Reduzida (GSH)

Para determinação da concentração de GSH foi utilizado o método descrito por Sedlak e Lindsay (1968). Devido ao tamanho reduzido do tecido coletado, adotaram-se as mesmas proporções de amostra, reagente e substrato utilizadas por Lange (2007), porém, em volume reduzido.

Ao volume de 30 μL do sobrenadante foram adicionados 7,5 μL de ácido tricloroacético (TCA, Neon) 50%, que foram agitados em *vórtex* e centrifugados a 10.000 g a 4 °C. Na microplaca, foram adicionados 10 μL do homogenato, 46 μL de tampão Tris-base (0,4 mol L⁻¹) e 4 μL de DTNB (2,5 mmol L⁻¹). Para este biomarcador foi utilizada uma curva-padrão de GSH com as concentrações 0, 2,5, 5, 10, 20, 40 e 80 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Para a curva, na microplaca foram adicionados 10 μL de GSH, 2 μL de TCA (50%), 34 μL de tampão Tris-base (0,4 mol L⁻¹) e 4 μL de DTNB (2,5 mM). Depois de 1 min, a formação de TNB (ácido 5-tio-2-nitrobenzóico), expressa por coloração amarela, foi medida a 412 nm.

$$[\text{GSH}] = \frac{[(\text{Abs.média} - \text{Abs.Branco}) \div \text{Coef.ang}] \times (\text{V total no poço} \div \text{V de amostra no poço})}{[\text{Proteínas Totais}]} \quad (4)$$

Em que:

Abs= absorvância

V = volume

[GSH] = $\mu\text{g} \cdot \text{mg proteínas}^{-1}$

[Proteínas Totais] = concentração de proteínas em mg.mL^{-1}

4.1.11 Glutathiona-S-transferase (GST)

O ensaio foi realizado segundo metodologia descrita por Keen, Habig e Jakoby (1976) adaptada a volumes reduzidos. Para análise da atividade global de GST, 30 μL do sobrenadante de fígado foi diluído em tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹) em pH 6,5, na proporção 1:4. Na microplaca foram adicionados 20 μL da amostra e 60 μL do meio de reação composto por CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno - 2,5 mmol L⁻¹, Sigma-Aldrich) e GSH (glutathiona reduzida - 2mmol L⁻¹, Sigma-Aldrich). A absorvância foi medida a 340 nm por 2 min, a cada 12 s.

$$\text{Ativ. GST} = \frac{(\Delta\text{Abs. min}^{-1} \times 1000) \div (d \cdot \epsilon) \times \text{diluição do tecido}}{[\text{Proteínas Totais}] \div (V \text{ total no poço} \div V \text{ de amostra no poço})} \quad (5)$$

Em que:

Ativ. GST = atividade de GST em nmol . min⁻¹ . mg proteínas⁻¹

V = volume

$\Delta\text{Abs. min}^{-1}$ = variação da absorbância em 1 min.

d = caminho óptico percorrido pelo feixe de luz ($v_{\text{poço}} = 80 \mu\text{L}$) = 0,24 cm

ϵ = absorvidade molar = 9,6 m mmol L⁻¹ . cm⁻¹

[Proteínas Totais] = concentração de proteínas em mg.mL⁻¹

4.2 ETAPA 2

4.2.1 Aclimação dos Organismos-Teste

Os exemplares de *Astyanax altiparanae* utilizados nesta etapa foram provenientes da empresa “Alevinos Curitiba”. A aclimação em laboratório ocorreu por um período de 30 dias, nas mesmas condições descritas na Etapa 1. A temperatura se manteve em $25 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$ e o pH em $6,4 \pm 0,4$.

4.2.2 Bioensaio

Neste biensaio foram testadas duas concentrações diferentes de losartana potássica (Aurobindo Pharma, Índia, 99%) em um único tempo de exposição. Previamente, os peixes foram mantidos por sete dias em ambientação nos aquários (20L) preparados com água filtrada e dechlorada. A fim de se evitar o estresse dos indivíduos, os aquários foram envoltos por papel do tipo Kraft, de modo que uma de suas faces laterais e metade de sua face frontal fossem cobertas (Figura 16). Foram testadas as concentrações 0,25 e 2,5 mg L⁻¹ de losartana, durante o tempo de exposição de 24 h, em sistema estático. Os peixes ($4,65 \pm 0,49 \text{ cm}$; $1,75 \pm 0,46 \text{ g}$) foram distribuídos em cinco indivíduos por aquário, havendo três aquários por grupo: controle (sem adição de losartana), losartana 0,25 mg L⁻¹ e losartana 2,5 mg L⁻¹.

Figura 16 - Ensaio de exposição de *Astyanax altiparanae* à losartana potássica (Etapa 2).



Fonte: A autora (2016).

Durante esse experimento, optou-se por realizar a alimentação dos organismos, a fim de se reduzir o estresse dos mesmos. Os peixes foram alimentados com ração comercial em pellet contendo 25% de proteína (Kowalski), na porção diária de um pellet por peixe. Decorridas 24 h do momento da contaminação com o fármaco, dez peixes de cada grupo foram coletados para amostragem dos tecidos.

4.2.4 Coleta e Preparo de Amostras

A eutanásia dos animais, coleta e preparo das amostras de tecidos dos peixes ocorreu de maneira exata ao já descrito na Etapa 1 (4.1.3). Na Etapa 2, o equipamento utilizado para a leitura das microplacas foi o leitor de microplacas modelo Epoch 2 (*Biotek Instruments*).

4.2.5 Concentração de Proteínas Totais

A concentração de proteínas totais foi determinada igualmente ao procedimento descrito no item 4.1.8.

4.2.6 Acetilcolinesterase (AChE)

A atividade da acetilcolinesterase, tanto cerebral quanto muscular, foi desenvolvida de acordo com o item 4.1.10. Para cérebro, a diluição da amostra em solução tampão foi 1:10, enquanto que para o músculo foi 1:15.

4.2.7 Glutationa Reduzida (GSH)

Assim como na Etapa 1, a determinação da concentração de GSH foi baseada no método descrito por Sedlak e Lindsay (1968), porém utilizando-se volumes diferentes.

Adicionou-se 12,5 μL de ácido tricloroacético (TCA, Neon) 50% a 50 amostra μL , seguindo para a agitação em *vórtex* e centrifugação a 10.000 g sob 4 °C. Na microplaca, foram adicionados 30 μL do homogenato, 138 μL de tampão Tris-base (0,4 mol L⁻¹) e 12 μL de DTNB (2,5 mmol L⁻¹). A curva-padrão de GSH foi preparada com as concentrações 0, 2,5, 5, 10, 20, 40 e 80 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Para a curva, na microplaca foram adicionados 30 μL de GSH, 6 μL de TCA (50%), 132 μL de tampão Tris-base (0,4 mol L⁻¹) e 12 μL de DTNB (2,5 mmol L⁻¹). Depois de 1 min, a absorbância foi medida em 412 nm. A concentração de GSH foi determinada com base na Equação 3.

4.2.8 Glutationa-S-transferase (GST)

Para análise da atividade de GST (KEEN et al., 1976) 50 μL do sobrenadante de fígado foi diluído em tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹) em pH 6,5, na proporção 1:5. Na microplaca foram adicionados 50 μL da amostra e 150 μL do meio de reação composto por CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno - 2,5 mM, Sigma-Aldrich) e GSH (glutationa reduzida - 2mM, Sigma-Aldrich). A absorbância foi medida a 340 nm por 2 min, a cada 30 s. A Equação 4 foi aplicada para o cálculo de atividade da GST, adotando-se d (caminho óptico percorrido pelo feixe de luz) igual a 0,6, correspondente ao volume total de 200 μL no poço da microplaca.

4.2.9 Monitoramento da Cinética da Losartana Potássica

Com o objetivo de monitorar a concentração de losartana durante o tempo de exposição dos peixes à losartana, foram coletadas amostras em todos os aquários contaminados e em um aquário controle (sem adição de fármaco). As coletas foram realizadas nos tempos 0, 6, 12 e 24 h. Para cada tempo, foram retirados 10 mL de água de cada aquário, sendo esse conteúdo transferido diretamente para vials (1,5 mL) de cromatografia. A análise das amostras foi realizada pelos mesmos métodos cromatográficos descritos no item 4.1.4.

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram testados quanto à normalidade através do teste Kolmogorov–Smirnov. Para o ensaio cometa, as medianas dos escores foram submetidas ao teste Kruskal-Wallis, seguido de Dunn. Para os biomarcadores bioquímicos da Etapa 1, aplicou-se o teste de Mann-Whitney ou Teste t não pareado, de acordo com a normalidade dos dados. Na Etapa 2, os dados obedeceram os critérios de normalidade e por isso, utilizou-se a análise de variância de uma via para verificar se havia diferença entre os grupos, seguida de Teste de Bonferroni para demonstrar as diferenças entre os grupos. A correlação entre GST e GSH e entre biomarcadores e tempo foi verificada através do cálculo do coeficiente correlação de Pearson (r). Todos os dados foram analisados pelo programa *GraphPad Prism* (GraphPad Software, Inc.), sendo os testes reconhecidos como estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ETAPA 1

5.1.1 Ensaio Preliminar

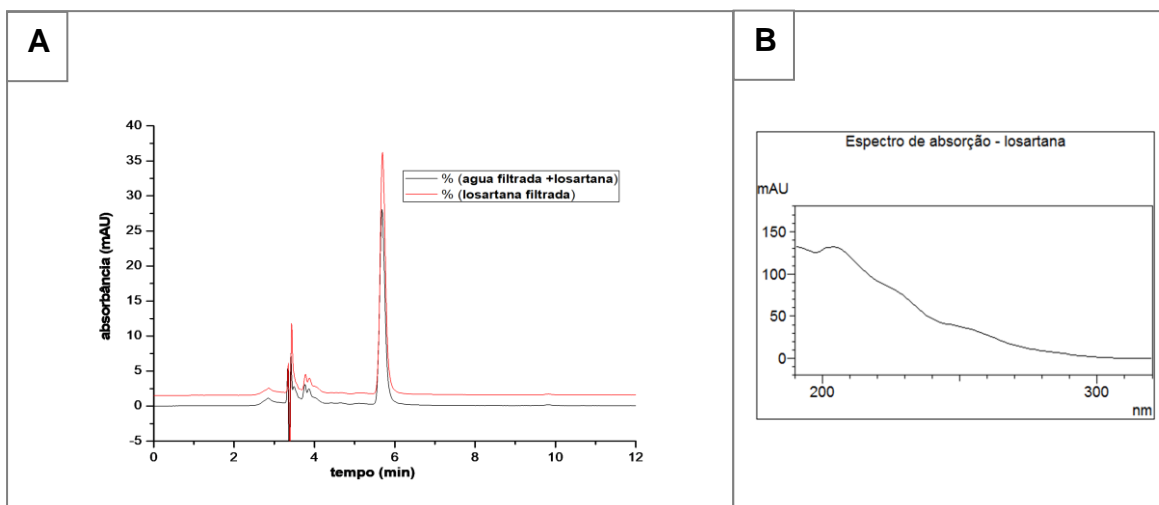
O objetivo principal dos ensaios preliminares é racionalizar tempo e material, aumentando a eficiência do ensaio (KNIE; LOPES, 2004). O teste preliminar definido por Knie e Lopes (2004) deve ser executado do mesmo modo que o definitivo, porém com menor número de indivíduos e com tempo de exposição reduzido. O teste preliminar realizado neste estudo teve como finalidade descartar a possibilidade de que a concentração definida pudesse levar os peixes à morte.

Nas três concentrações testadas (0,25, 2,5 e 25 mg L⁻¹) não foi constatada mortalidade dos indivíduos após 24 h de exposição, o que permitiu a realização do teste definitivo na concentração desejada (2,5 mg L⁻¹). Entretanto, em relação aos outros aquários, notou-se que na maior concentração (25 mg L⁻¹) os peixes apresentaram maior lentidão ao se movimentar, ficando parados a maior parte do tempo.

5.1.2 Análise da Estabilidade da Losartana Potássica

Os Experimentos A e B (Figura 17) foram desenvolvidos com o propósito de verificar se, durante o preparo das amostras para as análises cromatográficas, a losartana potássica poderia ser retida durante a filtração. Os resultados demonstraram que a losartana não foi retida na membrana, uma vez que as concentrações determinadas em ambos os experimentos foram as mesmas.

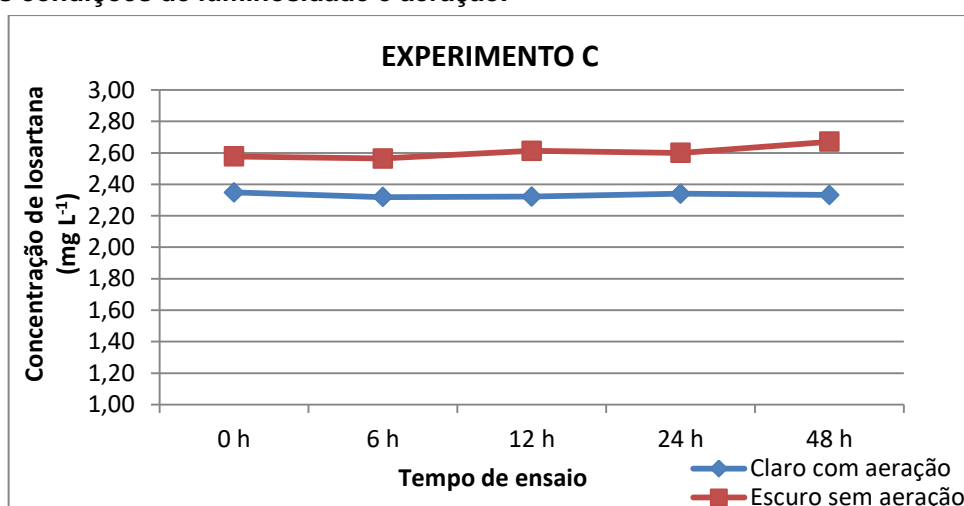
Figura 17 - Experimentos A e B - Aspectos cromatográficos da losartana potássica.



(A) Cromatogramas de soluções de losartana ($2,5 \text{ mg L}^{-1}$) preparadas em água de aquário (com filtração prévia da água e com filtração da solução após preparo). Tempo de retenção 5,8 min; comprimento de onda: 254 nm. (B) Espectro de absorção UV da banda cromatográfica referente à losartana.

O Experimento C (Figura 18), que foi desenvolvido com os aquários “claro” e “escuro”, teve o objetivo de verificar a fotodegradabilidade da losartana e também sua variação em relação à aeração.

Figura 18 - Experimento C - Análise da degradabilidade da losartana potássica mediante diferentes condições de luminosidade e aeração.

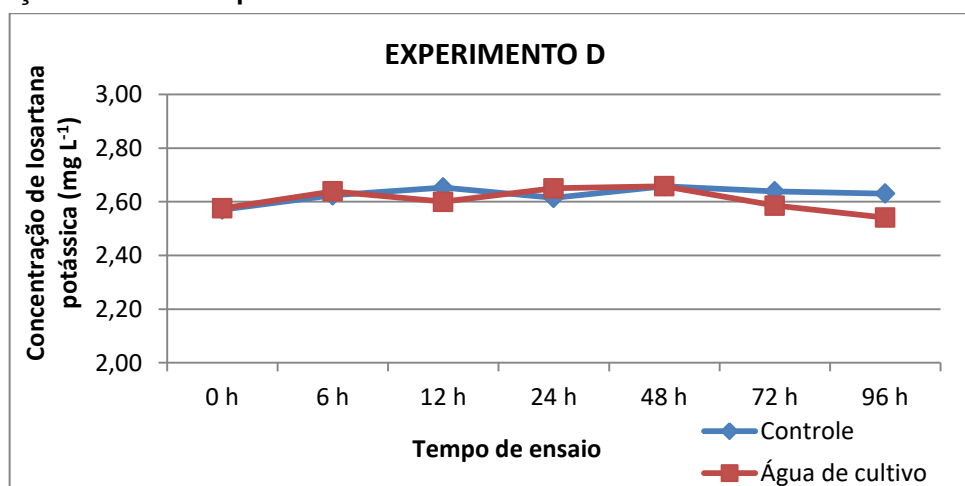


Legenda: Relação entre concentração da losartana potássica em aquários mantidos sob fotoperíodo de 12 h (CLARO) e com aeração X aquários sem fotoperíodo (ESCURO) e sem aeração. CV= 5,94%.

Foi verificado que as concentrações do fármaco se mantiveram constantes ao longo do ensaio nos dois aquários. A variação de concentração losartana potássica entre aquário “claro” e aquário “escuro” foi baixa, apresentando concentração média de $2,47 \text{ mg L}^{-1}$ de losartana e $\text{CV}= 5,94\%$. Esses resultados indicam que o composto não foi degradado durante o experimento,

Para se investigar a interferência da matéria orgânica dos peixes na concentração de losartana nos aquários, foram realizados os Experimentos D e E. Os resultados relativos ao Experimento D, com água do tanque de aclimação de peixes estão na Figura 19 .

Figura 19 - Experimento D - Análise da interferência da água de cultivo dos peixes sobre a concentração de losartana potássica.

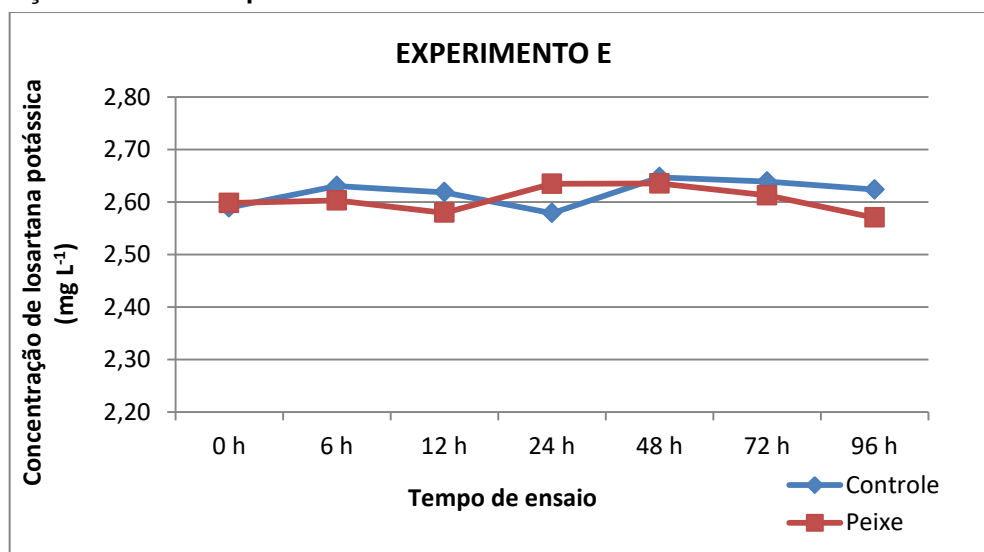


Legenda: Relação entre concentração da losartana potássica em aquários com água filtrada (CONTROLE) e água de cultivo dos peixes. $\text{CV}= 1,42\%$.

Os resultados demonstraram que a losartana potássica se manteve constante durante o ensaio, tanto no aquário com água de tanque de aclimação de peixes, quanto no aquário controle. A concentração média da losartana foi de $2,62 \text{ mg L}^{-1}$, não tendo sido verificada variação da concentração entre os dois aquários, uma vez em que o CV obtido foi de $1,42\%$.

A fim de se confirmar o resultado obtido no experimento anterior, foi realizado o Experimento E (Figura 20), desta vez verificando-se a estabilidade da losartana em aquário com peixes.

Figura 20 - Experimento E - Análise da interferência da presença dos peixes sobre a concentração de losartana potássica.



Legenda: Relação entre concentração da losartana potássica em aquários com e sem peixes (CONTROLE). CV= 0,96%.

Assim como nos experimentos anteriores, os dados do Experimento E evidenciaram que a concentração da losartana se manteve estável. A média da concentração da losartana nos aquários foi de 2,6 mg L⁻¹. Para o aquário com peixes, a concentração inicial de losartana potássica foi de 2,6 mg L⁻¹, caindo para 2,57 mg L⁻¹ no tempo 96 h. Este sutil decaimento sugere a absorção do fármaco pelos organismos. Comparando-se o aquário com peixes e o aquário controle, obteve-se CV= 0,96%, indicando que a presença dos organismos não afetou significativamente a concentração do fármaco. Conclui-se através dos experimentos C, D e E, que a losartana apresentou estabilidade mediante as variáveis de tempo, exposição à luz e presença de organismos-teste.

5.1.3 Biomarcadores Bioquímicos e Genético

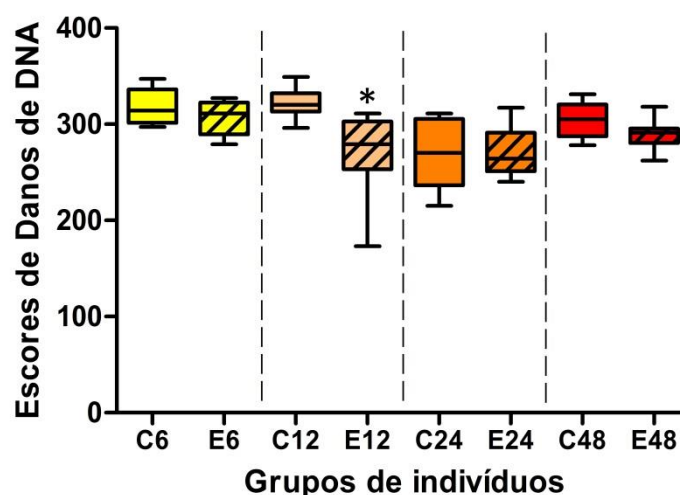
A intenção da exposição dos organismos a uma única concentração de fármaco, variando os tempos de exposição, foi verificar uma possível relação dos efeitos nos biomarcadores em função do tempo, para então conduzir um segundo ensaio com diferentes concentrações de losartana potássica. A fim de se garantir que os efeitos observados no ensaio com concentração única fossem realmente relativos à losartana potássica, foi adotado um grupo controle (C) para cada grupo

exposto ao fármaco (E). Dessa maneira, a cada tempo (6, 12, 24 e 48 h), foram analisados os grupos mantidos sob as mesmas condições, sendo a exposição ao fármaco a única diferença entre eles.

5.1.4 Ensaio cometa

Os resultados de dano genético observado nos peixes são apresentados na Figura 21. Observa-se que no tempo 12 h, o grupo exposto à losartana (E12) apresentou escore de dano de DNA estatisticamente inferior ao do seu grupo controle (C12). Nos demais tempos, não foi verificada diferença significativa.

Figura 21 - Escores de danos genéticos obtidos por ensaio cometa em eritrócitos de *Astyanax altiparanae* expostos à losartana potássica.



Legenda: (C) representa os grupos controle, enquanto que (E) indica os grupos expostos à losartana potássica na concentração única de $2,5 \text{ mg L}^{-1}$; 6, 12, 24 e 48 indicam o tempo de exposição em horas. Os resultados expressos em mediana. Dados analisados através do teste Kruskal-Wallis, seguido de Dunn. (*) indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle $p < 0,05$. $n=10$.

Considerando ensaios toxicológicos, Silva-Oliveira, Orsolin e Nepomuceno (2016) afirmam que, isoladamente, a losartana potássica não possui efeito genotóxico. Brambilla e Martelli (2005) indicam que o fármaco apresenta resultados negativos para testes de quebras de cadeia de DNA, mutação genética e aberrações cromossômicas. Os escores reduzidos verificados no presente estudo, especificamente o escore de E12, também podem sugerir propriedades protetivas da

losartana potássica. Krivosiková et al. (2001) verificaram, através de ensaio cometa, que a losartana pode atuar na prevenção de danos ao DNA. No estudo, após três meses de tratamento com losartana, observou-se que roedores submetidos à nefrectomia subtotal (remoção subtotal de rim) obtiveram redução significativa do número de quebras do DNA quando comparados a organismos sem tratamento ($p < 0,001$).

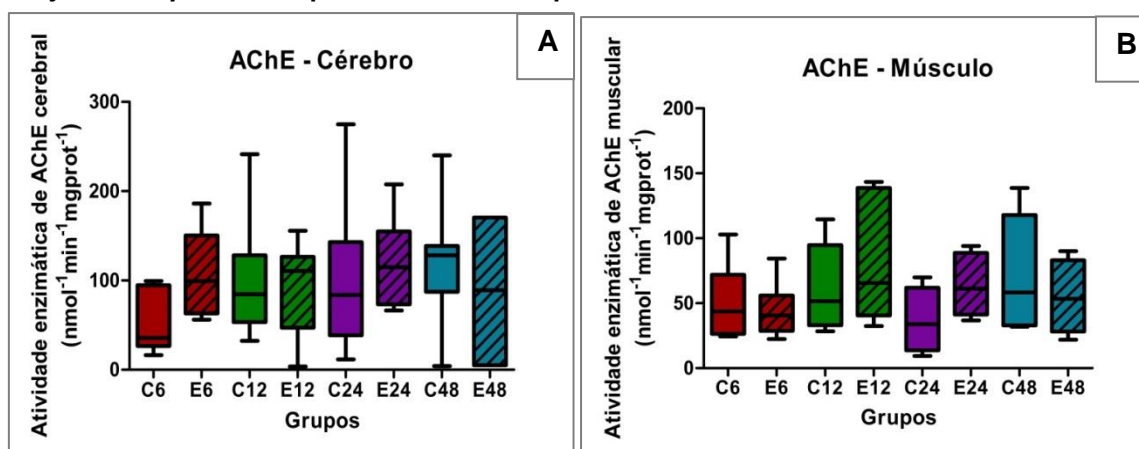
Silva-Oliveira, Orsolin e Nepomuceno (2016) também afirmam que, além de atuar na regulação da pressão sanguínea, a losartana pode possuir também propriedades anticancerígenas. Isso é reforçado por Kim et al. (2014), que verificaram que o bloqueio do receptor AT1 pode suprimir a proliferação de células cancerosas em roedores. Nesse estudo, a losartana aumentou significativamente a sobrevivência de ratos com câncer de pâncreas. Enquanto que o grupo controle apresentou índice de sobrevivência de $59,6 \pm 13,4$ dias, o grupo tratado com losartana potássica apresentou sobrevivência de $76,9 \pm 18,7$ dias ($p < 0,05$) (KIM, et al, 2014).

O presente estudo foi conduzido com concentração única de contaminante, variando os tempos de exposição. Como a diminuição dos danos só foi observada no tempo de 12 h, não foi possível estabelecer uma relação com o tempo de exposição. Desta maneira, considerando os resultados e as informações toxicológicas da losartana potássica, pode-se especular que a exposição ao fármaco tenha provocado um possível efeito protetivo da losartana sobre o DNA dos peixes, o que justificaria os menores escores de danos de DNA nos grupos expostos ao composto.

5.1.5 Biomarcadores Bioquímicos

Os dados referentes à atividade da acetilcolinesterase em cérebro e músculo de *Astyanax altiparanae* são apresentados na Figura 22.

Figura 22 - Atividade enzimática da acetilcolinesterase medida em cérebro e músculo de *Astyanax altiparanae* expostos à losartana potássica.



Legenda: (C) representa os grupos controle, enquanto que (E) indica os grupos expostos à losartana potássica na concentração única de 2,5 mg L⁻¹; 6, 12, 24 e 48 indicam o tempo de exposição em horas. Os resultados expressos em mediana \pm erro padrão. Dados analisados através de Teste de Mann-Whitney. (*) indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$). $n = 10$.

Como observado na Figura 22, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Assim como a atividade de AChE cerebral, os resultados da análise de AChE muscular não apresentaram diferença significativa.

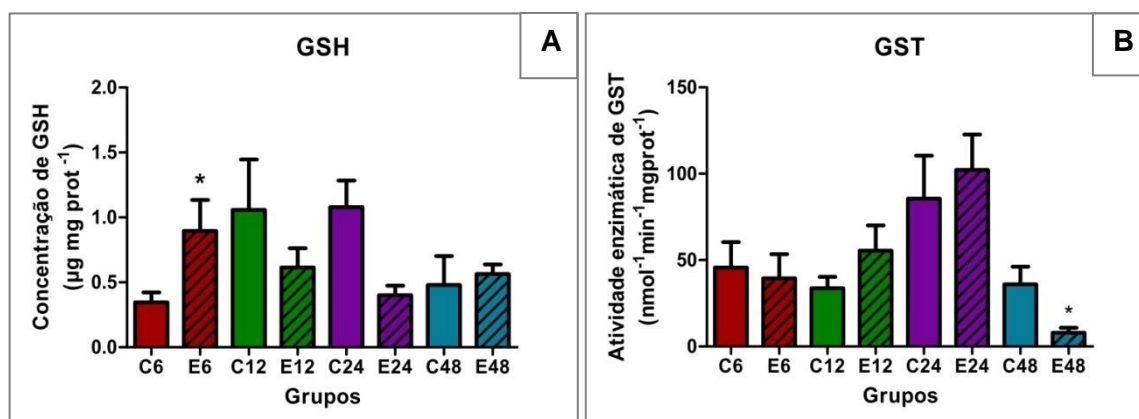
A alteração da atividade da acetilcolinesterase é reconhecidamente ocasionada por organofosforados e carbamatos, usados principalmente como pesticidas (KING; AARON, 2015); metais, como cádmio, arsênio, cobre e mercúrio (OLIVEIRA; ASSIS; BEZERRA, 2011); fármacos anticolinesterásicos, utilizados no tratamento da doença de Alzheimer (RAMOS; HAMDAN, 2014), e por poluentes em misturas complexas (RAMSDORF, 2011).

Os fármacos anticolinesterásicos atuam na redução da degradação do neurotransmissor acetilcolina. Um estudo realizado por Rozzini et al. (2005) demonstrou que um grupo de pacientes que fizeram uso de anticolinesterásicos associados a anti-hipertensivos - incluindo antagonistas do receptor de angiotensina II - tiveram significativa melhora na cognição se comparados a pacientes que não utilizaram anti-hipertensivos. Esses resultados são reforçados por Rahman (2014), que informa que pacientes hipotensos que utilizaram losartana também obtiveram melhora cognitiva. Isso pode sugerir que este fármaco possui potencial inibidor da enzima AChE, o que foi corroborado pelos estudos de Kumar et al. (2015) e Nade et al. (2015), em que roedores expostos à losartana potássica

tiveram significativa inibição da atividade de acetilcolinesterase cerebral ($p < 0,01$). No presente estudo, os resultados demonstram que a exposição à losartana potássica não alterou significativamente a atividade da enzima nos dois tecidos.

Quanto às análises dos biomarcadores de estresse oxidativo, GSH e GST, os resultados são apresentados na Figura 23.

Figura 23 - Concentração de glutatona reduzida e atividade enzimática da glutatona-S-transferase medidas em fígado de *Astyanax altiparanae* expostos à losartana potássica.



Legenda: (C) representa os grupos controle, enquanto que (E) indica os grupos expostos à losartana potássica na concentração única de $2,5 \text{ mg L}^{-1}$; 0, 6, 12, 24 e 48 indicam o tempo de exposição em horas. Os resultados expressos em média \pm erro padrão. Dados analisados através Teste t não pareado. (*) indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$). $n=10$.

A análise da concentração de GSH indicou que, comparando-se os grupos expostos à losartana aos seus respectivos controles, houve um aumento da concentração de GSH no tempo 6 h. Para os demais tempos, não houve diferença. Em C6, $[\text{GSH}] = 0,34 \pm 0,07 \text{ } \mu\text{g mg prot}^{-1}$, enquanto que E6 apresentou $[\text{GSH}] = 0,89 \pm 0,23 \text{ } \mu\text{g mg prot}^{-1}$ ($p = 0,048$).

Para Preiser (2012), o conceito de estresse oxidativo está relacionado à produção de espécies reativas de oxigênio, que possuem potencial tóxico, e pela presença de sistemas de desintoxicação. As consequências desse estresse podem ser a adaptação da célula ou organismo pela regulação dos sistemas de defesa, lesão ou morte celular (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004). A GSH desempenha diversas funções biológicas importantes, destacando-se a sua atuação como antioxidante e detoxificante de xenobióticos. A manutenção da concentração intracelular desse tripeptídeo é fundamental para a proteção celular. Ao entrar em

contato com espécies reativas, a GSH é convertida em GSSG que em excesso, pode causar lesões oxidativas em diversas estruturas celulares (HUBER; ALMEIDA, 2008; VIEIRA et al., 2014).

No processo de desintoxicação, promove-se a conjugação da GSH com o contaminante, a fim de promover a sua excreção e prevenir danos à célula. Como resultado desta conjugação, GSH é consumida e sua concentração na célula é reduzida (GHELFI, 2014). Em contrapartida, a ocorrência de concentrações elevadas de GSH é relacionada por Martinez (2006) a uma adaptação ao aumento da atividade de desintoxicação. Segundo Vieira et al. (2014), a concentração de GSH pode ser aumentada para neutralizar as espécies oxidantes, o que demonstra a proteção do organismo contra o estresse oxidativo.

A elevação da concentração de GSH na espécie *Astyanax altiparanae* foi identificado por Almeida (2016) num experimento de exposição ao agrotóxico imidacloprido. Após 96 h, a autora verificou o aumento significativo ($p < 0,001$) do tripeptídeo no músculo dos peixes, atribuindo isso a uma defesa do organismo contra danos oxidativos. Abdalla (2016) expôs *A. altiparanae* aos metais alumínio (Al) e manganês (Mn) durante 24 e 96 h. No tempo 24 h, os resultados demonstraram que a concentração de GSH aumentou em grupos expostos a Al e também a Al + Mn ($p \leq 0,05$). Esse aumento, identificado nas brânquias, foi associado à indução da síntese de GSH para proteção contra o estresse oxidativo resultante da exposição ao alumínio. Esses dados demonstram a ação antioxidante exercida pela GSH como uma primeira linha de defesa, em um processo de adaptação. No tempo 96 h, a concentração de GSH retornou aos níveis do controle (ABDALLA, 2016).

O efeito do anti-hipertensivo losartana potássica sobre a GSH ainda não é bem compreendido (BAYORH et al., 2003). Polizio e Peña (2005) constataram a redução de GSH no rim de roedores após ingestão de losartana por um período de 14 dias. Em contrapartida, no trabalho de Kim et al. (2011) os roedores expostos à losartana durante seis meses obtiveram valores de GSH renal aumentados em relação aos não expostos. Observa-se, através desses dados, a complexidade dos estudos toxicológicos. Apesar de se tratar de espécies diferentes, os organismos utilizados nos dois estudos são bastante semelhantes. Nota-se a especificidade dos

efeitos dos compostos de estudo quanto ao tempo de exposição, espécie e condições empregadas.

Como mecanismo de defesa dos organismos à exposição ao fármaco, a concentração elevada de GSH obtida neste estudo (Figura 23A, E6) pode demonstrar a ativação de um mecanismo de adaptação ao estresse oxidativo. Assim como no trabalho de Abdalla (2016), o estresse foi identificado apenas no tempo inicial do experimento, já que os níveis de GSH foram restabelecidos nos tempos posteriores.

A Figura 23B apresenta os dados referentes ao biomarcador GST. A atividade no tempo 48 h demonstra que a enzima foi inibida, podendo indicar estresse oxidativo. Em C48, a atividade de GST foi $35,95 \pm 10,18 \text{ nmol}^{-1}\text{min}^{-1}\text{mgprot}^{-1}$, enquanto que para E48 a atividade foi $7,92 \pm 2,89 \text{ nmol}^{-1}\text{min}^{-1}\text{mgprot}^{-1}$ ($p = 0,038$). Para os demais tempos, não foi verificada alteração na atividade enzimática.

O processo de biotransformação dos contaminantes pode acarretar na formação de espécies reativas que, como já descrito anteriormente, são combatidas por agentes antioxidantes. Desta maneira, a GST está envolvida no metabolismo de compostos orgânicos ao promover a conjugação de diversos substratos eletrofílicos (oriundos da primeira fase da biotransformação) com a GSH (MOTA, et al. 2013; TRUJILLO-JIMÉNEZ et al. 2011). Mota et al. (2013) sugere que a indução de GST seja favorável ao processo de desintoxicação celular, mas classifica a inibição desta enzima como pouco compreendida. Para Mota et al. (2015), a redução da atividade de GST pode estar relacionada à geração de espécies reativas de oxigênio no processo de biotransformação, enquanto que Samanta et al. (2014) afirmam que a redução da atividade da enzima pode estar associada a uma falha no processo de desintoxicação celular.

No presente estudo, os resultados do ensaio cometa poderiam sugerir que a losartana potássica tem a capacidade de proteger o DNA de danos. Considerando trabalhos com testes toxicológicos já desenvolvidos com o fármaco, a possibilidade de a losartana prevenir danos ao material genético parece ser mais coerente. Entretanto, novos testes investigativos devem ser realizados a fim de que esse efeito sobre a espécie *A. altiparanae* possa ser confirmado. Quanto às análises dos biomarcadores bioquímicos, a neurotoxicidade não foi verificada, já que não houve indução ou inibição de AChE nos tecidos analisados. Em relação ao estresse

oxidativo, os dados de GSH e GST demonstram que a losartana pode ocasionar esse processo na espécie. A atividade de GST não apresentou correlação com a concentração de GSH ($r < 0,05$).

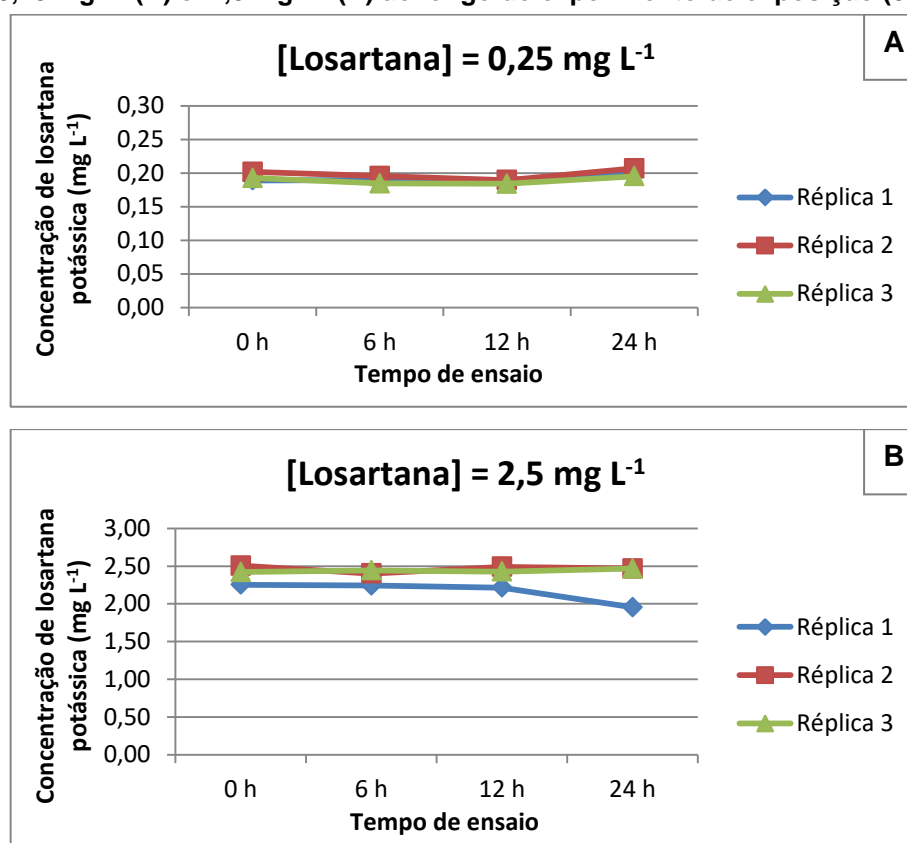
Os biomarcadores tiveram resultados expressivos em tempos diferentes de exposição. Ensaio cometa, GSH e GST apresentaram-se alterados nos tempos 12, 6 e 48 h, respectivamente, o que demonstra a particularidade temporal da alteração observada nos biomarcadores. Em nenhuma das análises foi identificada correlação entre a expressão dos resultados e o tempo de ensaio ($r < 0,1$). Desta maneira, foi realizada a Etapa 2 desta pesquisa, fixando o tempo total de exposição em 24 h e procurando verificar a resposta dos organismos a concentrações distintas de losartana.

5.2 ETAPA 2

5.2.1 Monitoramento Cinético da Losartana Potássica

Os resultados referentes à estabilidade da losartana durante o ensaio da Etapa 2 são apresentados na Figura 24, a fim de que os efeitos observados possam ser melhor elucidados.

Figura 24 - Variação da concentração da losartana potássica nos aquários de concentração nominal = $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ (A) e $2,5 \text{ mg L}^{-1}$ (B) ao longo do experimento de exposição (0-24h).

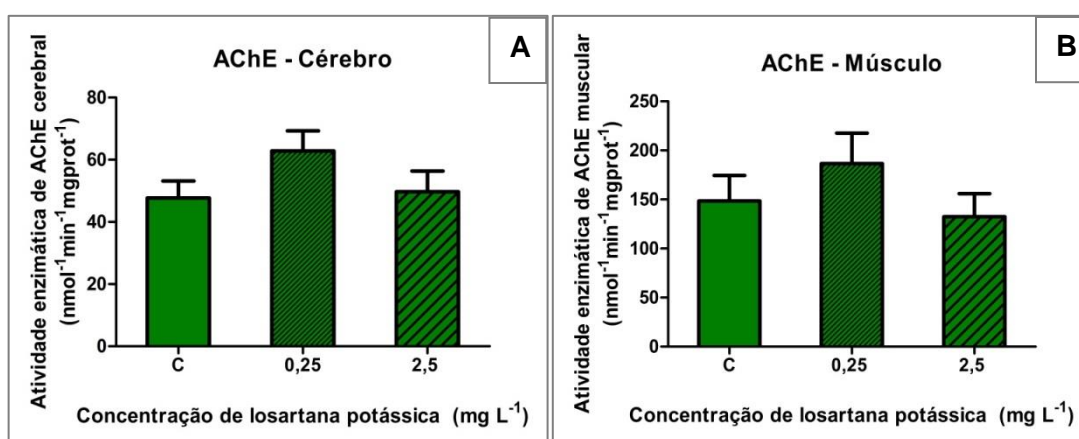


Nos aquários de concentração $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ (Figura 24A) a losartana potássica foi medida com concentração média igual a $0,2 \text{ mg L}^{-1}$, se mantendo estável ao longo do experimento, com $\text{CV} = 3,05\%$. Para a concentração nominal de $2,5 \text{ mg L}^{-1}$ (Figura 24B), a média foi $2,4 \text{ mg L}^{-1}$ e o CV ainda menor, $1,79\%$. Esses resultados são compatíveis com o obtido nos experimentos de estabilidade desenvolvidos na Etapa 1, confirmando a estabilidade do fármaco ao longo do bioensaio.

5.2.2 Biomarcadores Bioquímicos

Os resultados referentes à atividade de acetilcolinesterase são apresentados na Figura 25. Assim como na Etapa 1, não foi constatada diferença significativa da atividade de AChE cerebral e muscular entre os grupos expostos e grupos controle.

Figura 25 - Atividade enzimática da acetilcolinesterase medida em cérebro e músculo de *Astyanax altiparanae* expostos à losartana potássica nas concentrações 0,25 e 2,5 mg L⁻¹ por 24 horas.

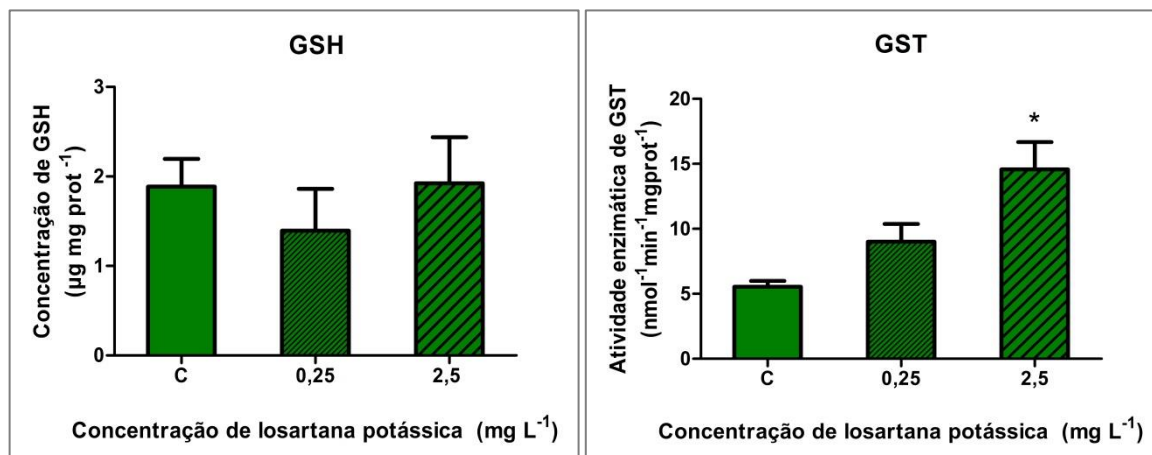


Legenda: (C) representa os grupos controle. Resultados expressos em média ± erro padrão. Dados analisados através ANOVA de uma via, seguida de Bonferroni. (*) indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle (p<0,05). n=10.

Para AChE cerebral a média da atividade foi de $53,67 \pm 3,68 \text{ nmol}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg prot}^{-1}$, inferior à média detectada na Etapa 1, mas dentro da esperada para o nível basal da enzima na espécie. A média da atividade da AChE muscular foi de $156,58 \pm 15,84 \text{ nmol}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg prot}^{-1}$, maior ao detectado na Etapa 1, mas também dentro dos valores encontrados na literatura para peixes não expostos a contaminantes.

A concentração de GSH e atividade de GST são contempladas na Figura 26. A média da concentração de GSH dos grupos foi $1,72 \pm 0,23 \mu\text{g} \cdot \text{mg prot}^{-1}$. Este valor foi superior ao detectado na Etapa 1 e, diferentemente, não demonstrou alteração no biomarcador. Também não houve correlação da atividade de GST e concentração de GSH ($r < 0,2$).

Figura 26 - Concentração de glutatona reduzida e atividade da glutatona-S-transferase medida em fígado de *Astyanax altiparanae* expostos à losartana potássica nas concentrações 0,25 e 2,5 mg L⁻¹ por 24 horas.



Legenda: (C) representa os grupos controle. Resultados expressos em média \pm erro padrão. Dados analisados através ANOVA de uma via, seguida de Bonferroni. Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). $n = 10$.

A Figura 26B evidencia que a GST foi induzida pela losartana potássica em concentração 2,5 mg L⁻¹ enquanto que na concentração 0,25 mg L⁻¹ não houve alteração da atividade enzimática. A indução foi demonstrada pela atividade de $14,57 \pm 2,10 \mu\text{g} \cdot \text{mg prot}^{-1}$ nos grupos expostos, estatisticamente superior à atividade de $5,54 \pm 0,44 \mu\text{g} \cdot \text{mg prot}^{-1}$ dos grupos controle ($p < 0,05$). Conforme Sun et al. (2017), a indução desta enzima está associada ao estímulo ao processo de desintoxicação do contaminante pelo organismo.

Comparando-se esses dados aos da Etapa 1, um ponto que se destaca é a diferença da atividade basal de GST entre as duas etapas. Na Etapa 1, o controle 24 h (C24) apresentou atividade de $85,57 \pm 24,83 \mu\text{g} \cdot \text{mg prot}^{-1}$, bem contrastante com a já referida atividade de $5,54 \pm 0,44 \mu\text{g} \cdot \text{mg prot}^{-1}$ do controle da Etapa 2. Contudo, ambos se mostram similares aos dados encontrados na literatura para a atividade enzimática em *Astyanax altiparanae*. Isso demonstra que mesmo organismos da mesma espécie, analisados por meio das mesmas ferramentas, podem apresentar diferentes valores enzimáticos basais. Outro ponto que deve ser reconhecido é que os dados da Figura 26B demonstram que na Etapa 1, mesmo sem diferença estatística entre os grupos, é possível verificar que a atividade de GST no grupo exposto à losartana por 24 h (E24), foi numericamente superior ao valor identificado

no grupo controle (C24). Em E24, a atividade foi de $102,16 \pm 20,57 \mu\text{g.mg prot}^{-1}$, enquanto que em C24, obteve-se o valor de $85,57 \pm 24,83 \mu\text{g.mg prot}^{-1}$ ($p = 0,63$).

Estudos de exposição de lambari à losartana ainda não foram publicados. Em contrapartida, os efeitos de vários contaminantes em *Astyanax sp.* já foram avaliados. No trabalho de Freire et al. (2015), a fim de se verificar a saúde desses organismos no rio Iguaçu (Brasil), os lambaris foram coletados no outono e na primavera em dois pontos, e analisados quanto a diversos biomarcadores, dentre eles, a glutathione-S-transferase. As análises revelaram que durante o outono, os peixes apresentaram indução de GST, que foi associada à alta concentração de poluentes na estação.

No estudo realizado por Osório (2016), lambaris das espécies *Astyanax altiparanae* e *Astyanax bifasciatus* foram expostos ao inseticida organofosforado malathion. Para todas as concentrações do inseticida testadas, os peixes da espécie *A. altiparanae* tiveram a atividade da GST inibida, enquanto que *A. bifasciatus* expostos à concentração intermediária do inseticida tiveram a atividade da GST aumentada. Mais uma vez, constata-se que os efeitos ecotoxicológicos, principalmente relativos aos biomarcadores, apresentam-se de maneira muito particular. Neste caso, organismos muito semelhantes entre si, do mesmo gênero, provenientes do mesmo habitat, expostos exatamente ao mesmo composto e mantidos sob as mesmas condições, apresentaram resultados diferentes. Bettim et al. (2016) utilizaram espécimes de *Astyanax altiparanae* para se analisar efeitos ecotoxicológicos decorrentes da exposição à fração solúvel em água da gasolina (WSFG - *water-soluble fraction of gasoline*). No fígado, foi verificada redução da GST após 96 h de exposição. Já no rim, a atividade de GST foi aumentada. Segundo os autores, a exposição a uma mistura de poluentes, como o WSFG, gera respostas bioquímicas complexas, não havendo efeitos específicos de biotransformação definidos.

Os resultados das duas etapas desenvolvidas neste trabalho sugerem um possível efeito protetivo da losartana ao DNA dos peixes expostos a ela. Em contrapartida, as análises de GSH e GST demonstram que o fármaco possui potencial para gerar estresse oxidativo em *Astyanax altiparanae*, que pode se manifestar de maneiras diferentes de acordo com o tempo de exposição. Já em

relação à AChE, a losartana não teve efeito sobre os tecidos estudados, e portanto, não demonstrou neurotoxicidade.

A losartana potássica é um fármaco relativamente novo, uma vez em que sua aprovação pelo FDA (*Food and Drug Administration*) foi dada apenas em 1995 (RIPLEY; HIRSCH, 2010). Isso talvez explique a ausência de dados ecotoxicológicos com o anti-hipertensivo mais consumido mundialmente. É importante salientar que mesmo em concentrações reduzidas, contaminantes emergentes podem apresentar efeitos em organismos presentes em corpos aquáticos, e, portanto, a verificação do potencial ecotoxicológico do fármaco deve ser aprofundada.

6 CONCLUSÃO

A realização de ensaios com organismos vivos por si só já é bastante desafiadora, uma vez em que os indivíduos, sensíveis às variáveis ambientais e temporais, podem responder de maneira singular. Através do trabalho realizado, verificou-se que o estudo ecotoxicológico utilizando biomarcadores genéticos e bioquímicos também possui esse caráter complexo.

Os ensaios preliminares da cinética da losartana potássica demonstraram a estabilidade do composto utilizado mediante as variáveis de: tempo, exposição à luz e presença de organismos-teste. Na Etapa 1, com o ensaio cometa, foram verificados escores de danos de DNA reduzidos em relação aos grupos controle, especialmente no tempo de exposição 12 h. Isso pode sugerir um efeito protetivo da losartana a esse material genético. Tanto para cérebro e músculo, a losartana não alterou significativamente a atividade de AChE. Para GSH e GST foi verificado, respectivamente, aumento da concentração e inibição da atividade enzimática.

Durante a Etapa 2, a losartana se manteve estável durante todo o experimento. A atividade de AChE e a concentração de GSH, não foram alteradas. Para GST, observou-se indução da atividade enzimática durante a exposição dos peixes ao fármaco na concentração $2,5 \text{ mg L}^{-1}$.

A relação entre o tempo e os efeitos observados não pôde ser definida. Verificou-se que os biomarcadores podem se expressar de maneira diferente de acordo com o tempo em que os organismos são expostos ao fármaco. A losartana não apresentou neurotoxicidade, mas pode ter ocasionado estresse oxidativo nos peixes. Nota-se, portanto, que mesmo em concentrações reduzidas, os fármacos podem apresentar efeitos em organismos presentes em corpos aquáticos, devendo o potencial ecotoxicológico desses agentes ser investigado.

REFERÊNCIAS

7ª Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial. **Revista da Sociedade Brasileira de Cardiologia**. Arquivos Brasileiros de Cardiologia. 2016. Disponível em: <http://publicacoes.cardiol.br/2014/diretrizes/2016/05_HIPERTENSAO_ARTERIAL.pdf>. Acesso em 11 jul. 2017.

ABREU, F. G.; BRANDÃO, J. L. B. Impactos e Desafios Futuros no Monitoramento dos Contaminantes Emergentes. In: Simpósio Brasileiro de Recursos Hídricos, XX, 2013, Bento Gonçalves. **Anais...** Porto Alegre: ABRH, 2013.

ABDALLA, R. P. Efeito do alumínio e manganês, em pH ácido, nos parâmetros de estresse oxidativo em machos de *Astyanax altiparanae* (Characiformes: Characidae). 2015. 60 f. Dissertação (Mestrado em Ciências - Fisiologia Geral) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

ALMEIDA, R. B. C. **Astyanax altiparanae (Pisces, Characiformes) como modelo biológico de espécie de peixe para exploração zootécnica e biomanipulação**. 2007. 119 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2007.

ALMEIDA, K.; COHEN, S. Diversidade de Monogenea (Platyelminthes) parasitos de *Astyanax altiparanae* do reservatório da Usina Hidrelétrica de Itaipu. **Revista Saúde & Ambiente**, v. 6, n.1, p. 31-41, 2011.

ALMEIDA, E. C. **Efeitos Bioquímicos e Genotóxicos do Inseticida Imidacloprido para *Astyanax altiparanae* (Teleostei: Characidae)**. 2016. 81 f. Dissertação (Mestrado em Meio Ambiente e Recursos Hídricos) - Universidade Federal de Itajubá, Itajubá, 2016.

ALVIM, M. Saiba quais foram os remédios mais vendidos no Brasil em 2015. **Lauro Jardim**, Rio de Janeiro, 2016. Disponível em: <<http://blogs.oglobo.globo.com/lauro-jardim/post/saiba-quais-foram-os-remedios-mais-vendidos-no-brasil-em-2015.html>>. Acesso em: 13 out. 2016.

ANDERSON, D. M. **Mosby's Medical Dictionary**. 9 th. United States of America: Elsevier, 2009.

ANDRADE, S. P. F. **Impacto dos Antibióticos Veterinários na Produção Primária dos Sistemas Aquáticos**. 2014. 70 f. Dissertação (Mestrado em Toxicologia e Contaminação Ambientais) - Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar, Universidade do Porto, Porto, 2014.

ARAUJO, C. R. et al. Estudo do comportamento térmico do fármaco losartana potássica. In: Congresso Brasileiro de Análise Térmica e Calorimetria, 9., 2014, Serra Negra. **Anais...** São Paulo: ABRATEC, 2014.

ARMILIATO, N. **Toxicidade Celular e Bioquímica do Glifosato sobre os Ovários do Peixe *Danio rerio***. 2014. 109 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e do Desenvolvimento) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.

AZEVEDO, F. A.; CHASIN, A. M. **As Bases Toxicológicas da Ecotoxicologia**. São Paulo: Editora Rima (Interfox), 2004.

BAIRD, S. F.; GIRARD, C. F. **Descriptions of new species of fishes collected in Texas**, New Mexico and Sonora, by Mr. John H. Clark, on the U. S. and Mexican Boundary Survey, and in Texas by Capt. Stewart Van Vliet, U.S.A: Proceedings of the Academy of Natural Science of Philadelphia, 1854.

BAUMANN, M. et al. Aquatic toxicity of the macrolide antibiotic clarithromycin and its metabolites. **Chemosphere**, v.120, p. 192 - 198, 2014.

BAYORH, M. A. et al. Effect of Losartan on Oxidative Stress-Induced Hypertension in Sprague-Dawley Rats. **American Journal of Hypertension**, v. 16, n. 5, p. 387 - 392, 2003.

BERNO, L. I.; POETA, P. T.; MARÓSTICA-JÚNIOR, M. R. Efeitos do Selênio Oriundo da Torta de Castanha-do-Brasil Sobre a Concentração de Glutathione Reduzida (Gsh) em Ratos Wistar. **Alimentos e Nutrição**. Araraquara, v. 21, p. 231-239, 2010.

BETTIM, F. L. et al. Biochemical responses in freshwater fish after exposure to water-soluble fraction of gasoline. **Chemosphere**, v. 144, p. 1467 - 1474, 2016.

BOGER, B. et al. Micropoluentes emergentes de origem farmacêutica em matrizes aquosas do Brasil: uma revisão sistemática. **Ciência e Natura**. Santa Maria, v. 37, n. 4, p. 725-739, 2015.

BOUISSOU-SCHURTZ, C. et al. Ecological risk assessment of the presence of pharmaceutical residues in a French national water survey. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 69, p. 296–303, 2014.

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

BRAGA, M. R. S. S. **Efeitos tóxicos subletais de piritionato de zinco em parâmetros toxicológicos de *Gambusia holbrooki***. 2013. 60 f. Dissertação (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Nota Técnica nº 128, de maio de 2012**. Brasília, DF, mai. de 2012. Trata sobre “losartana potássica + hidrocortiazida”. 2012. Disponível em: <<http://www.agu.gov.br/page/download/index/id/23589236>>. Acesso em: 03 set. 2016.

_____. Ministério da Saúde. **Portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011**. “Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade”. 2011c. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914_12_12_2011.html>. Acesso em: 23 out. 2016.

_____. Ministério da Saúde. **Resolução RDC nº 306, de 7 de dezembro de 2004**. “Dispõe sobre o Regulamento Técnico para o gerenciamento de resíduos de serviços de saúde”. Órgão emissor: ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2004. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2004/res0306_07_12_2004.html>. Acesso em: 23 out. 2016.

_____. Ministério do Meio Ambiente, Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução CONAMA nº 357, de 17 de março de 2005**. “Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências”. 2005b. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>>. Acesso em: 03 set. 2016.

_____. Ministério do Meio Ambiente, Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução CONAMA nº 358, de 29 de abril de 2005**. “Dispõe sobre o tratamento e a disposição final dos resíduos dos serviços de saúde e dá outras providências”. 2005a. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=462>>. Acesso em: 03 set. 2016.

_____. Ministério do Meio Ambiente, Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução CONAMA nº 430, de 13 de maio de 2011**. “Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA”. 2011a. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=646>>. Acesso em: 03 set. 2016.

_____. Presidência da República. **Lei nº 12.305, de 2 de agosto de 2010**. “Institui a Política Nacional de Resíduos Sólidos; altera a Lei no 9.605, de 12 de fevereiro de 1998; e dá outras providências”. Brasília, DF, 2 ago. 2010. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=636>>. Acesso em: 23 out. 2016.

_____. Senado. **Projeto de lei do Senado nº 148, 07 de abril de 2011**. “Altera a Lei nº 12.305, de 2 de agosto de 2010, para disciplinar o descarte de medicamentos de uso humano ou de uso veterinário”. 2011b. Disponível em: <<http://www25.senado.leg.br/web/atividade/materias/-/materia/99828>>. Acesso em: 23 out. 2016.

BRAMBILLA, G.; MARTELLI, A. Genotoxicity and carcinogenicity studies of antihypertensive agents. **Mutation Research**, v. 612, p. 115 - 149, 2005.

CAMARGO, A. A. et al. Metazoan parasite of lambari *Astyanax altiparanae*, collected from the Peixe river, São Paulo, southeast of Brazil. **Ciência Rural**, v. 46, n. 5, p. 876-880, 2016.

CARVALHO, W. L. et al. Mecanismos da intoxicação do fígado de rato causada pelo gossipol. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 3, p. 339-344, 2013.

CASTRO, J. et al. Biomarcadores histopatológicos na espécie *Hoplias malabaricus* (Pisces, Osteichthyes, Erythrinidae) em uma Unidade de Conservação de São Luís (MA). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, n. 6, p. 1687 - 1694, 2014.

COSTA JUNIOR, I. L.; PLETSCH, A. L. ; TORRES, Y. R. Ocorrência de Fármacos Antidepressivos no Meio Ambiente - Revisão. **Revista Virtual de Química**, v. 6, n. 5, p. 1408 - 1431, 2014.

COSTA-SILVA, D. G. et al. Oxidative stress markers in fish (*Astyanax sp.* and *Danio rerio*) exposed to urban and agricultural effluents in the Brazilian Pampa biome. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, p. 15526–15535, 2015.

DAMAS, L.; NASCIMENTO, M.; SOBRINHO, C. Prevalência de hipertensão e fatores associados em usuários do Programa Saúde da Família de um município do Nordeste brasileiro. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 23, n. 2, p. 39-46, 2016.

DIXON, D.; LAPTHORN, A.; EDWARDS, R. Plant glutathione transferases. **Genome Biology**, v. 3, n. 3, p.1-10, 2002.

DOMINGUES, M. S. **Citogenética Comparativa de *Astyanax altiparanae* Garutti e Britski, 2000 do Alto Rio Tibagi e Alto Rio Iguaçu**. 2005. 78 f. Dissertação (Mestrado em Genética) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

ELLMAN, G. et al A New And Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, p. 88-95, 1961.

EUROPEAN UNION. European Comission. JRC Technical Report. **Development of the first Watch List under the Environmental Quality Standards**. Directive 2008/105/EC, as amended by Directive 2013/39/EU, in the field of water policy Directive, 2015. Disponível em:

<<http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/bitstream/JRC95018/lbna27142enn.pdf>>. Acesso em: 17 jan. 2017.

FEITOSA, A.; BARBOSA, E. Tratamento Medicamentoso. **Departamento de Hipertensão Arterial da Sociedade Brasileira de Cardiologia**. [2017?]. Disponível em: <<http://departamentos.cardiol.br/dha/consenso3/capitulo5.asp>>. Acesso em: 16 jul. 2017.

FERREIRA, J. **Remoção de Micropoluentes Emergentes em Efluentes Sanitários Através de Carvão Ativado**. 2011. 162 f. Dissertação (Mestrado em Meio Ambiente Urbano e Industrial) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

FILLAFER, C.; SCHEINER, M. F. Does acetylcholinesterase deactivate acetylcholine? **Proceedings of The Physiological Society**, London, 2014. Disponível em: <<http://www.physoc.org/proceedings/abstract/Proc%20Physiol%20Soc%2031PCA086>>. Acesso em: 11 set. 2016.

FONSECA, M. Hipertensão arterial, risco cardiovascular e vitamina D. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 22., n. 1, p. 2 - 8, 2015.

FRANCO, Y.; FRANCO, L. Biotransformação: importância e toxicidade. **Saúde em Revista.**, Piracicaba, v. 5, n. 9, p. 69 - 76, 2003.

FREIRE, C. A. et al. A multibiomarker evaluation of urban, industrial, and agricultural exposure of small characins in a large freshwater basin in southern Brazil. **Environmental Science and Pollution Research.**, v. 22, p. 13263 -13277, 2015.

FREITAS, M. R. M. **Revisão taxonômica das espécies de *Astyanax* subgrupo *goyacensis* nas porções média e superior da drenagem do rio Tocantins**. 2011. 47 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia de Ecótonos) - Universidade Federal do Tocantins, Porto Nacional, 2011.

FROESE, R.; PAULY, D. Scientific Names where Genus Equals *Astyanax*. **Fish Base**, Philippines, 2013. Disponível em: <<http://www.fishbase.org/Nomenclature/ValidNameList.php?syng=astyanax&syms=&vtitle=Scientific+Names+where+Genus+Equals+%3Ci%3EAstyanax%3C%2Fi%3E&crit2=CONTAINS&crit1=EQUAL>>. Acesso em: 21 dez. 2016.

GAFFNEY, V. et al. Análise de fármacos em águas por SPE-UPLC-ESI-MS/MS. **Revista Química Nova.**, v. 37, n. 1, p. 138 - 149, 2014.

GARAVELLO, J. C.; SAMPAIO, F. A. A. Five new species of genus *Astyanax* (Baird e Girard, 1854) from Rio Iguaçu, Paraná, Brazil (Ostariophysi, Characiformes, Characidae). **Brazilian Journal of Biology**, v. 70, n. 3, p. 847-865, 2010.

GARCIA, L. Logística reversa de medicamentos descartados pelo consumidor. **Mattos Filho**. São Paulo, 2016. Disponível em : <<http://www.mattosfilho.com.br/pages/disp-imprensa.aspx?nID=1562>>. Acesso em: 20 dez. 2016.

GARUTTI, V; BRITSKI, H. A. Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Teleostei: Characidae) da bacia do alto Rio Paraná e considerações sobre as demais espécies do gênero na bacia. **Comunicações do Museu de Ciências da PUCRS, Série Zoologia**, v. 13, p. 65-88, 2000.

GHELFI, A. **Efeitos toxicológicos do diclofenaco em peixes *Rhamdia quelen***. 2014. 72 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Conservação) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

GIOLLO-JUNIOR, L et al. A avaliação da resposta anti-hipertensiva na otimização da rigidez arterial e pressão central. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 21, n. 1, p. 18 - 23, 2014.

GIUSTARINI, D. et al. *N*-Acetylcysteine ethyl ester (NACET): A novel lipophilic cell-permeable cysteine derivative with an unusual pharmacokinetic feature and remarkable antioxidant potential. **Biochemical Pharmacology**, v. 84, p. 1522 - 1533, 2012.

GOBO, C. G. **Efeito do losartan sobre o desenvolvimento Folicular de ratas wistar adultas, com obesidade induzida pela dieta de cafeteria** . 2014. 85 f. Dissertação (Mestrado em Biociências e Saúde) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, 2014.

GODOY, A. A. **Avaliação ecotoxicológica dos fármacos cloridrato de propranolol e losartana potássica, em ação individual e combinada, na macrófita *Lemna minor* L. (1753)**. 2014. 213 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia Ambiental) - Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, 2014.

GONZÁLEZ-PLEITER, M. et al. Toxicity of five antibiotics and their mixtures towards photosynthetic aquatic organisms: Implications for environmental risk assessment. **Water Research**, v. 47, p. 2050 - 2064, 2013.

GOUVEIA, A.; MAXIMINO, C.; BRITO, Thiago M. **Comportamento de peixes: Vantagens e utilidades nas neurociências**. Bauru: Faculdade de Ciências/UNESP, 2006.

GRÖNER, F.; ZIKOVÁ, A.; KLOAS, W. Effects of the pharmaceuticals diclofenac and metoprolol on gene expression levels of enzymes of biotransformation, excretion pathways and estrogenicity in primary hepatocytes of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C, v. 167, p. 51–57, 2015

GROS, M. ; RODRÍGUEZ-MOZAZ, S. ; BARCELÓ, D. Fast and comprehensive multi-residue analysis of a broad range of human and veterinary pharmaceuticals and some of their metabolites in surface and treated waters by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to quadrupole-linear ion trap tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1248, p. 104 -121, 2012.

GHELFI, A. **Efeitos toxicológicos do diclofenaco em peixes *Rhamdia quelen***. 2014. 72 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Conservação) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

GUIMARÃES, P. **Ensaio Ecotoxicológico como Ferramenta para Avaliação de Efluente de Truticultura**. 2014. 68 f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura e Pesca) - Instituto de Pesca, São Paulo, 2014.

GUIMARÃES, R. **Exposição a Organoclorados e Alterações em Caracteres Sexuais Primários e Secundários na População Exposta em Cidade dos Meninos, Brasil**. 2011. 233 f. Tese (Doutorado em Saúde Coletiva) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

GURGEL, H. Estrutura populacional e época de reprodução de *Astyanax fasciatus* (Cuvier) (Characidae, Tetragonopterinae) do Rio Ceará Mirim, Poço Branco, Rio Grande do Norte, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 21, n. 1, p.131-135, 2004.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **British Journal of Pharmacology**, v. 142, p. 231 255, 2004.

HARDMAN, J. et al. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 9 ed. México: Gooman & Gilman, McGraw-Hill, 1996.

HELMENSTINE, A. Glutathione chemical structure. **About Inc**. 2016. Disponível em: <<http://chemistry.about.com/od/chemistryglossary/g/Chemical-Formula-Definition.htm>>. Acesso em: 19 set. 2016.

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P.; FÁTIMA, A. Glutathione e Enzimas Relacionadas: Papel Biológico e Importância em Processos Patológicos. **Revista Química Nova**, v.31, n. 05, p. 1170-1179, 2008.

HUERTA-FONTELA, M.; GALCERAN, M. T; VENTURA, F. Occurrence and removal of pharmaceuticals and hormones through drinking water treatment. **Water Research**, v. 45, n. 3, p. 1432 - 1442, 2011.

HUGGETT, R. J.; KIMERIE, Richard A.; MEHRIE JR., Paul M.; BERGMAN, Harold L. **Biomarkers: biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress**. Boca Raton: Lewis Publishers, 1992.

HUSSAIN, B. et al. Variation in genotoxic susceptibility and biomarker responses in *Cirrhinus mrigala* and *Catla catla* from different ecological niches of the Chenab River. **Environmental Science and Pollution Research**., v. 23, p. 14589 - 14599, 2016.

IMS Institute for Healthcare Informatics. **Global Medicines Use in 2020**. Outlook and Implications. Parsippany, 2015.

JAVONILLO, R. et al. Relationships among major lineages of characid fishes (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes), based on molecular sequence data. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 54, p. 498 - 511, 2010.

JEBALI, J. I. et al. Multiple biomarkers of pollution effects in *Solea solea* fish on the Tunisia coastline. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 20, p. 3812 - 3821, 2012.

JESUS, T. B; CARVALHO, C. E. V. Utilização de Biomarcadores em Peixes como Ferramenta para Avaliação de Contaminação Ambiental por Mercúrio (Hg). **Oecologia Brasiliensis.**, v. 12, n. 4, p. 680 - 693, 2008.

KEEN, J. H.; HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Mechanism for the several activities of the glutathione S-transferases. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 251, n. 20, p. 6183-6188, 1976.

JIANG, Y. et al. Sublethal Toxicity Endpoints of Heavy Metals to the Nematode *Caenorhabditis elegans*. **Plos One**, v. 11, n. 1, p. 1 - 12, 2016.

KIM, J. M. et al. Inhibition of NF- κ B-induced inflammatory responses by angiotensin II antagonists in aged rat kidney. **Experimental Gerontology**, v. 46, p. 542 -548, 2011.

KIM, S. et al. Antitumor Effect of Angiotensin II Type 1 Receptor Blocker Losartan for Orthotopic Rat Pancreatic Adenocarcinoma. **Pancreas**, v 43, n. 6, p. 886 - 890, 2014.

KING; A.; AARON, C. K. Organophosphate and Carbamate Poisoning. **Emergency Medicine Clinics of North America**, v. 33, p. 133 - 151, 2015.

KLEIN; R.; KLEIN, O. What Glutathione (GSH) is and how it affects your immune health. **Immune Health Science**, United States of America, 2017. Disponível em: < <http://www.immunehealthscience.com/glutathione.html>>. Acesso em: 22 jan 2017.

KNIE, J. L. W.; LOPES, E. W. B. **Testes Ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicações**. Florianópolis: FATMA / GTZ, 2004.

KRIVOSIKOVÁ, Z. et al. DNA damage of lymphocytes in experimental chronic renal failure: Beneficial effects of losartan. **Kidney International**, v. 59, p S-212 - S215, 2001.

KUMAR, A. et al. Neuroprotective mechanism of losartan and its interaction with nimesulide against chronic fatigue stress. **Inflammopharmacology**, v. 23, n. 6, p. 291 -305, 2015.

KÜSTER, A.; ADLER, N.. Pharmaceuticals in the environment: scientific evidence of risks and its regulation. **Philosophical Transactions of The Royal Society B**, v. 369, p. 1 - 8, 2014.

LANGE, M. V. **Aspectos bioquímicos do efeito da fração solúvel do petróleo em *Astyanax sp.*** 2007. 45 f. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

LAPUENTE, J. et al. The comet assays and its applications in the field of

ecotoxicology: a mature tool that continues to expand its perspectives. **Frontiers in Genetics**, v. 6, 2015.

LARSSON, J.; PEDRO, C.; PAXEUS, N. Effluent from drug manufactures contains extremely high levels of pharmaceuticals. **Journal of Hazardous Materials**, v. 148, p.751 - 755, 2007.

LI, W. C. Occurrence, sources, and fate of pharmaceuticals in aquatic environment and soil. **Environmental Pollution**, v. 187, p. 193-201, 2014.

LYONS, G. **Pharmaceuticals in the environment: A growing threat to our tap water and wildlife**. United Kingdom: CHEM Trust, 2014. Disponível em <<http://www.chemtrust.org.uk/wp-content/uploads/CHEM-Trust-Pharma-Dec14.pdf>>. Acesso em: 17 jan. 2017.

MARGOT, J. et al. Treatment of micropollutants in municipal wastewater: Ozone or powdered activated carbon? **Science of the Total Environment**, v 461 - 462, p. 480 - 498, 2013.

MARINI, F.; BRANDI, M. L. Pharmacogenetics of Osteoporosis: Future Perspectives. **Calcified Tissue International**, v. 84, p. 337-47, 2009.

MARTINEZ, C. B. R. Parâmetros bioquímicos de peixes para avaliação da qualidade da água. In: Ângela Teresa Silva-Souza. (Org.). Sanidade de Organismos Aquáticos no Brasil, [2006?], Maringá. **Anais...** Maringá: ABRAPOA, [2006?], p. 43-62

MATTOS, J. **Respostas bioquímicas e moleculares no peixe *Poecilia vivipara* exposto à fração de óleo diesel acomodada em água**. 2010. 120 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

MERCK. **Losartana Potássica**. Rio de Janeiro, 2015.

MÉRONA, Bernard et al. **Peixes do baixo rio Tocantins: 20 anos depois da Usina Hidrelétrica Tucuruí**. et al., 2004. Brasília, Eletronorte, 2004.

MONTELLA; I. R.; SCHAMA, Renata; VALLE, Denise. The classification of esterases: an important gene family involved in insecticide resistance - A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 4, p. 437 - 449, 2012.

MOREIRA, J. C.; GONÇALVES, Eline S. Contaminantes Emergentes. **Revista de Química Industrial**, p.4-13, 1º trimestre 2013, 2013.

MOTA, S. B. et al. Avaliação da toxicidade aguda do Roundup® em juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*). In: Congresso de Iniciação Científica PIBIC/CNPq - PAIC/FAPEAM, 2, 2013, Manaus. **Anais...** Manaus: Inpa, 2013, p. 2.

_____. Roundup exposure promotes gills and liver impairments, DNA damage and inhibition of brain cholinergic activity in the Amazon teleost fish *Colossoma macropomum*. **Chemosphere**, v. 135, p. 53-60, 2015.

MSD. **Coozar**: losartana potássica. Merck Sharp & Dohme Farmacêutica Ltda, 2012. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=7960152015&pIdAnexo=2837802>. Acesso em: 17 abr. 2016.

NADE, V. et al. Cognitive enhancing effect of angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin receptor blockers on learning and memory. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 47, n. 3, p. 263-269, 2015.

OGA, S.; CARMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J. A. O. **Fundamentos de Toxicologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu Editora São Paulo, 2008.

OLIVEIRA, J. M.; AREND, C. O.; GERBER, W. D. Dossiê Técnico: **Toxicidade em efluentes industriais**. SENAI-RS, Centro Nacional de Tecnologias Limpas, 2011.

OLIVEIRA, L. L. **Biomarcadores enzimáticos e testes ecotoxicológicos na avaliação de fármacos em invertebrados aquáticos**. 2014. 279 f. Tese (Doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

OLIVEIRA, V.; ASSIS, C.; BEZERRA, R. Atividade in vitro da acetilcolinesterase cerebral de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) sensível a metais pesados. In: Reunião Anual do Instituto Biológico, 24, 2011, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Editora do Instituto Biológico, 2011.

OLIVEIRA, V. et al. Efeitos do FeCl₂ e CuCl₂ na atividade da acetilcolinesterase cerebral de *Oreochromis niloticus*. **Natural Resources**, v. 2, n. 2, p. 27 - 36, 2013.

OLIVI, P. et al. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Revista Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1820-1830, 2008.

OOSTERHUIS, M; SACHER, F.; TER LAAK, T. L. Prediction of concentration levels of metformin and other high consumption pharmaceuticals in wastewater and regional surface water based on sales data. **Science of the Total Environment**, v. 442, p. 380 - 388, 2013.

OROPESA, A. L.; SANCHES, S.; SOLER, F. Characterization of plasma cholinesterase activity in the Eurasian Griffon Vulture *Gyps fulvus* and its in vitro inhibition by carbamate pesticides. **International journal of avian Science**, v. 159, n. 3, p. 510 - 518, 2017.

OSÓRIO, F. H. T. **Validação do gênero *Astyanax* (Baird e Girard, 1854) como bioindicador de testes ecotoxicológicos**. 2016. 119 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2016.

OSTLING, O.; JOHANSON, K. J. (1984) Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 123, n. 1, p. 291 - 298, 1984.

PAIXÃO, C. et al. Polimorfismos Genéticos da Família Citocromo P450 E o Câncer. **SAÚDE & CIÊNCIA EM AÇÃO – Revista Acadêmica do Instituto de Ciências da Saúde**, v. 3, n. 1, p. 118 - 133, 2017.

PAMPLONA, J. H. **Avaliação dos Efeitos Tóxicos da Dipirona Sódica em Peixe Rhamdia Quelen**: Estudo Bioquímico, Hematológico e Histopatológico. 2009. 70 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

PARANÁ. Palácio do Governo. **Lei 17.211, de 03 de Julho de 2012**. “Dispõe sobre a responsabilidade da destinação dos medicamentos em desuso no Estado do Paraná e seus procedimentos”. 2012. Disponível em: <www.saude.pr.gov.br/arquivos/File/lei17211.doc>. Acesso em: 10 jan. 2017.

PARANÁ. Secretaria do Meio Ambiente e Recursos Hídricos. **Decreto n º 9213, de 23 de outubro de 2013**. “Regulamenta a Lei nº 17.211, de 03 de julho de 2012, que dispõe sobre a responsabilidade da destinação dos medicamentos em desuso no Estado do Paraná e seus procedimentos, e dá outras providências”. 2013. Disponível em: <<https://www.legisweb.com.br/legislacao/?id=261098>>. Acesso em: 10 jan. 2017.

PEAKALL, D. W. Biomarkers: the way forward in environmental assessment. **Toxicology and Ecotoxicology News**, v. 1, p. 55-60, 1994.

PEREIRA, C. et al. Occurrence of pharmaceuticals and cocaine in a Brazilian coastal zone. **Science of the Total Environment**. p. 148 -154, 2016.

PETERSON, R. C., DUNLAK, Mark E. **Angiotensin II Receptor Blockers in the Treatment of Heart Failure**, 2002. Disponível em: <http://www.medscape.com/viewarticle/443196_2>. Acesso em 01. set. 2016.

PIRES, N.; FARIA, A.; MODOLO, R. Hipertensão arterial em pacientes com doença arterial coronariana – metas pressóricas. **Revista BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO**, V. 23, N.1, P. 8 - 15, 2016.

PREISER, J. C. Oxidative Stress. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 36, n. 2, p. 147 - 154, 2012.

POMPELLA, A. et al. The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. **Biochemical Pharmacology**, v. 66, n. 8, p. 1499–1503, 2003.

POLIMANTI, R. et al. Genetic variability of glutathione S-transferase enzymes in human populations: Functional inter-ethnic differences in detoxification systems. **Gene**, v. 512, p. 102 - 107, 2012.

POLIZIO, A.; PEÑA, C. Effects of angiotensin II type 1 receptor blockade on the oxidative stress in spontaneously hypertensive rat tissues. **Regulatory Peptides**, v. 128, p. 1 - 5, 2005.

RAHMAN, S. **Theres something very interesting about a certain blood pressure pill and dementia**, 2014. Disponível em: <<https://livingwelldementia.org/2014/11/05/theres-something-very-interesting-about-a-certain-blood-pressure-pill-and-dementia/>>. Acesso em: 11 set. 2016.

RAMOS, A.; HAMDAN, A. Avaliação Neuropsicológica na Doença Alzheimer e Demência Frontotemporal: critérios nosológicos. **Interação em Psicologia**, v. 18, n. 3, p. 391 - 397, 2014.

RAMSDORF, W. A. **Avaliação da Toxicidade dos compostos Fipronil, Nitrato de Chumbo e Naftaleno em Peixes**. 2011. 178 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

RANI, M. et al. Assessment of organophosphates induced acetylcholinesterase inhibition in Indian major carps. **Journal of Entomology and Zoology Studies**. v. 5, n. 2, p. 1369 - 1371, 2017.

RIPLEY, E.; HIRSCH, A. Fifteen years of losartan: what have we learned about losartan that can benefit chronic kidney disease patients? **International Journal of Nephrology and Renovascular Disease**, v. 3, p. 93 -98, 2010.

RONCO, A.; BAÉZ, M.; GRANADOS, Y. Ensayo de toxicidad aguda con Allium cepa L mediante la evaluación de la inhibición del crecimiento promedio de raíces de cebolla. In: Gabriela Cartillo. (Edit.). **Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Aguas: Estandartización, Intercalibración, Resultados e Aplicaciones**. México: Coordinación de Tecnología de Comunicación, 2004.

ROZZINI, L. et al. Effects of cholinesterase inhibitors appear greater in patients on established antihypertensive therapy. **International Journal Of Geriatric Psychiatry**, v. 20, p. 547 - 551, 2005.

SACRAMENTO, A. R. B. **A genotoxicidade dos biomateriais em medicina dentária**. 2012. 32 f. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina Dentária) - Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto, Porto, 2012.

SAMANTA, P. et al. Biochemical effects of glyphosate based herbicide, Excel Mera 71 non enzyme activities of acetylcholinesterase (AChE), lipidperoxidation (LPO), catalase (CAT), glutathione-S-transferase (GST) and protein content on teleostean fishes. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 107, p. 120 -125, 2014.

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

SANTOS, L. Contribution of hospital effluents to the load of pharmaceuticals in urban wastewaters: Identification of ecologically relevant pharmaceuticals. **Science of the Total Environment**, v 461-462, p. 302-316, 2013.

SATO, J. A. P. **Caracterização Estrutural De Insumos Farmacêuticos Ativos E Medicamentos Anti-hipertensivos**. 2015. 211 f. Tese (Doutorado em Nanociências e Materiais Avançados) - Universidade Federal do ABC - Santo André, 2015.

Sociedade Brasileira de Hipertensão. **O que é hipertensão?** São Paulo, 2017. Disponível em: <<http://www.sbh.org.br/geral/faq.asp>>. Acesso em: 14 fev. 2017.

SCHÄFER, R. B. et al. **Environmental Toxicology and Chemistry**. USA: SETAC, 2013.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**, v. 25, p. 192-205, 1968.

SILVA DE ASSIS, H. C. **Der Einsatz Von Biomarkern zur summarischen Erfassung von Gewässerverschmutzungen**. 2008. 83 f. Tese (Doutorado em Ciências Naturais-Ecotoxicologia) - Universidade Técnica de Berlim, Berlim, 1998.

SILVA-OLIVEIRA, R. G.; ORSOLIN, P. C.; NEPOMUCENO, J. C. Modulating effect of losartan potassium on the mutagenicity and recombinogenicity of doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 95, p211 - 218, 2016.

SILVEIRA, E. L. **Estrutura populacional, biologia reprodutiva e alimentar de espécies de *Astyanax* Baird & Girard, 1854 (Teleostei: characidae) na Bacia do Rio São João, Carambeí, Paraná**. 2014. 166 f. Dissertação (Mestrado em Zoologia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

SINGH, N. et al. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, p. 184–191, 1988.

Sociedade Brasileira de Hipertensão. Dia nacional de combate a hipertensão é marco da luta contra 300 mil mortes por ano. 2008. Disponível em: <<http://www.sbh.org.br/geral/noticias.asp?id=115>>. Acesso em 20 out. 2016.

SOUZA, D. P. **Avaliação de Contaminantes Emergentes do tipo HPA no Riacho Algodoads Suape-PE, e Tratamento via Processo Oxidativo Avançado**. 2012. 103 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2012.

SPEIT, G.; HARTMANN, A. The comet assay (single-cell gel test). In: DNA Repair Protocols. **Humana Press**, 1999, p. 203-212.

_____. The Comet Assay: A Sensitive Genotoxicity Test for the Detection of DNA Damage and Repair. **Methods in Molecular Biology**, p. 275-286, 2006.

SUN, L. et al. Physiological basis for isoxadifen-ethyl induction of nicosulfuron detoxification in maize hybrids. *Plos One*, v. 12, n. 3, p. 1 -16, 2017.

TAYLOR, D.; SENAC, T. Human pharmaceutical products in the environment – The “problem” in perspective. **Chemosphere**, v. 115, p. 95 - 99, 2014.

TORRES, N. et al. Fármacos No Ambiente – Revisão. **Revista de Estudos Ambientais**, v.14, n. 4, p. 67-75, 2012.

TRAVASSO, R. A. P. **Avaliação do perfil de biomarcadores enzimáticos em *Sardina pilchardus***. 2011. 62 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Aplicada) - Universidade de Aveiro, Aveiro: 2011.

TRUJILLO-JIMÉNEZ, P. Assessing environmental conditions of the Río Champotón (México) using diverse indices and biomarkers in the fish *Astyanax aeneus* (Günther, 1860). **Ecological Indicators**, v. 11, p. 1636–1646, 2011.

United States of America-FDA. **Review of environmental assesment of Coozar tablets**, 2002.

UNIVERSITÄT WÜRZBURG. **Lehrstuhl für Toxikologie**. Würzburg, 2016. Disponível em: <http://www.toxikologie.uni-wuerzburg.de/en/general_information/>. Acesso em: 23 jan. 2017.

USEPA - United States Environmental Protection Agency. **Pharmaceuticals and Personal Care Products (PPCPs) in Water**, 2013. Disponível em: <<http://water.epa.gov/scitech/swguidance/ppcp/index.cfm>>. Acesso em: 12 dez. 2016.

VANDEPUT, M. et al. Flow-through enzyme immobilized amperometric detector for therapid screening of acetylcholinesterase inhibitors by flowinjection analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 102, p. 267–275, 2015

VELHO, A. et al. Trabalhando a Problemática Ambiental ao Viés de Quadros Colaborativos Online: Uma Ação no Contexto Escolar. In: Congresso Brasileiro de Informática na Educação, V, 2016, Uberlândia. **Anai...** Uberlândia: SBC; UFU, 2016, p. 446 - 455.

VENTURA, L. et al. Single Cell Gel Electrophoresis (Comet) assay with plants: Research on DNA repair and ecogenotoxicity testing. **Chemosphere**, v. 92, p. 1 -9, 2013.

VICENTE, G. H. L. **Desenvolvimento e validação de um método analítico para determinação dos fármacos Diclofenaco, Nimesulida e Paracetamol em águas superficiais da cidade de São Carlos - SP**. 2011. 67 f. Dissertação (Mestrado em

Química Analítica) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

VIEIRA, C. et al. Integrated biomarker response index using a Neotropical fish to assess the water quality in agricultural areas. **Neotropical Ichthyology**, v. 12, n. 1, p. 153 - 164, 2014.

VILELA, C.; HAYASHI, C. Desenvolvimento de juvenis de lambari *Astyanax bimaculatus*(Linnaeus, 1758), sob diferentes densidades de estocagem em tanques-rede. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 23, n. 2, p. 491-496, 2001.

XISTER, R. et al. Densidade de estocagem de alevinos no cultivo de lambaris. In: Mostra Nacional de Iniciação Científica e Tecnológica Interdisciplinar, 12., 2014, Araquari. **Resumos...** Araquari: Instituto Federal Catarinense, 2014, p. 1.

WU, Y. et al. Retinoid X receptor regulates glutathione homeostasis and xenobiotic detoxification processes in mouse liver. **Molecular Pharmacology**, v. 64, n. 3, p. 550 – 557, 2004.

YAMAMOTO, N. et al. Avaliação dos efeitos biológicos do fármaco Losartan em microcrustáceos *Daphnia similis* e *Ceriodaphnia dubia* (CRUSTACEA, CLADOCERA). **UNISANTA BioScience**, v. 1, n.2, p. 49 - 53, 2012.

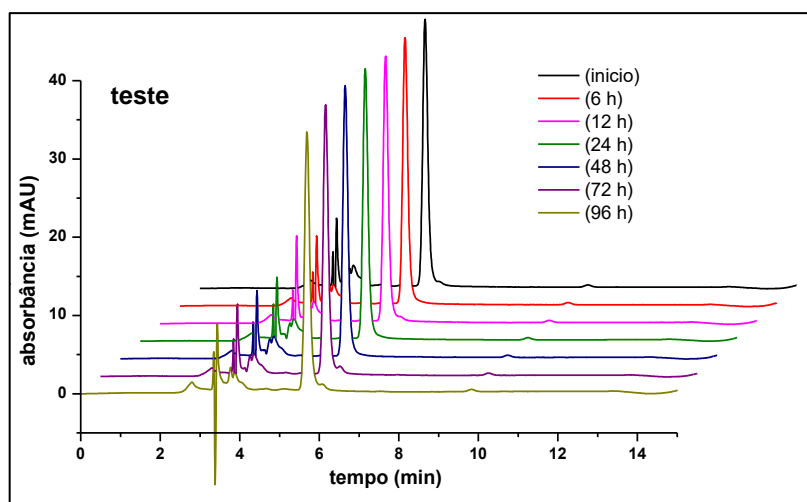
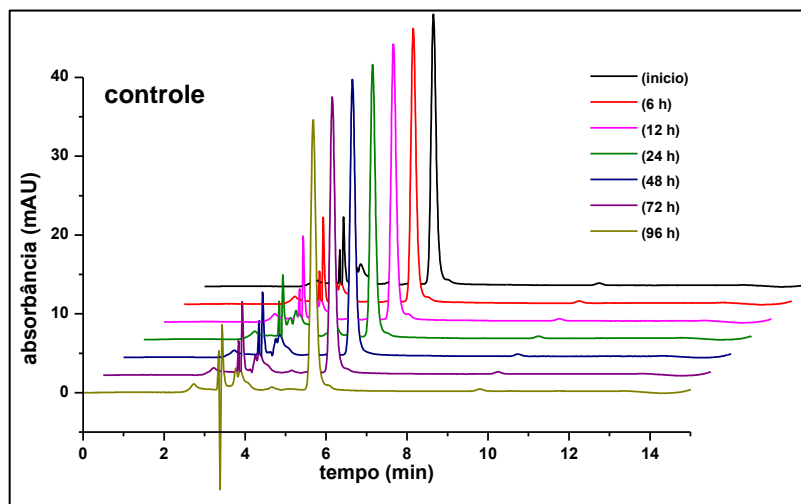
_____. **Avaliação ecotoxicológica dos fármacos anti-hipertensivos losartan e valsartan em ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus* (Echinodermata, Echinoidea)**. 2014. 72 f. Dissertação (Mestrado em Ecossistemas Costeiros e Marinheiros) - Universidade Santa Cecília, Santos, 2014.

YU, X. et al. A combine devaluation of the characteristics and acute toxicity of antibiotic wastewater. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 106, p. 40–45, 2014.

ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações**. 2. ed. São Carlos: RiMa, 2008.

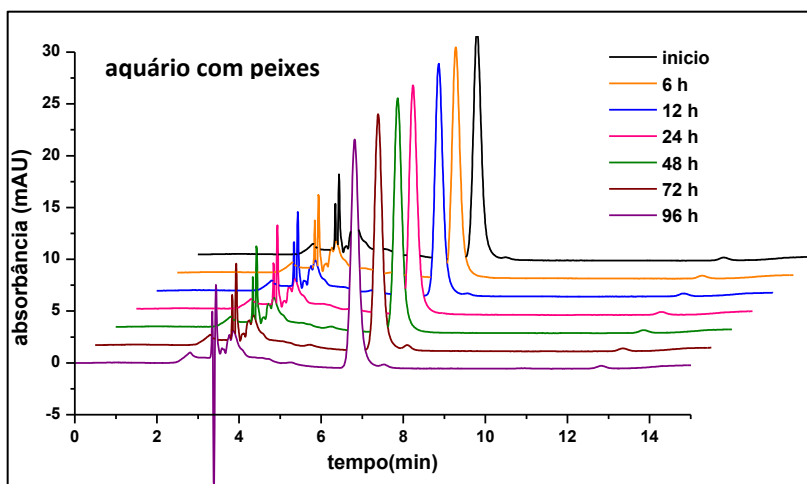
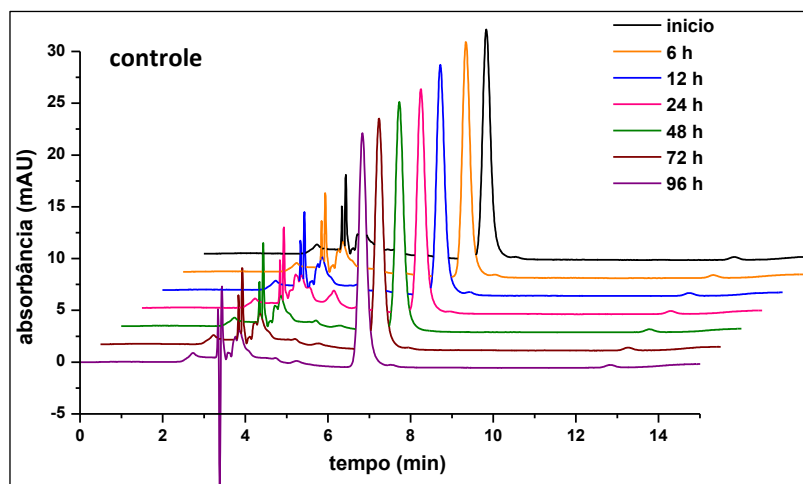
ZENKER, A. et al. Bioaccumulation and biomagnification potential of pharmaceuticals with a focus to the aquatic environment. **Journal of Environmental Management**, v. 133, p. 378 - 387, 2014.

APÊNDICE A - Experimento D (Etapa 1) - Estabilidade Da Losartana Potássica Em Água De Tanque De Aclimação De Peixes



Legenda: Cromatogramas referentes a amostragens nos tempos 0, 6, 12, 24, 48, 72 e 96 h. (controle) água de clorada; (teste) água de tanque de aclimação de peixes.

APÊNCICE B - Experimento E (Etapa 1) - Estabilidade Da Losartana Potássica Em Aquário Com Peixes



Legenda: Cromatogramas referentes a amostragens nos tempos 0, 6, 12, 24, 48, 72 e 96 h. (controle) água de clorada; (teste) água de tanque de aclimação de peixes.

ANEXO A - Parecer CEUA (Parte 1)



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
Câmpus Dois Vizinhos
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA



PROJETO DE PESQUISA / AULA PRÁTICA

Título:	ECOTOXICIDADE DE FÁRMACOS E SUBPRODUTOS DE DEGRADAÇÃO APÓS TRATAMENTO POR PROCESSOS AVANÇADOS DE OXIDAÇÃO
Área Temática:	2.10.07.00-4 – Toxicologia
Pesquisador / Professor:	ADRIANE MARTINS DE FREITAS
Instituição:	UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ – CAMPUS CURITIBA
Financiamento:	CAPES-CNPQ
Versão:	02

PARECER CONSUBSTANCIADO DA CEUA	Protocolo nº 2015-011
<p>Apresentação do Projeto: Trata-se de projeto no qual os pesquisadores buscam avaliar <i>in vivo</i> a ecotoxicidade do antibiótico rifampicina, bem como de seus derivados após degradação por processos avançados de oxidação (AOPs). Será utilizado como organismo experimental o peixe <i>Astyanax sp</i> (lambari). Os pesquisadores se comprometem a seguir a NBR 15.088/2011 que trata sobre testes de ecotoxicidade usando peixes. Segundo o formulário apresentado serão utilizados 180 animais, os quais serão mantidos por 30 dias para aclimação em tanques de 250 L com água filtrada e dechlorada e serão controlados os parâmetros de temperatura, pH e oxigenação da água. Depois os animais serão transferidos para aquários de 25 L nos quais será realizado um teste preliminar de toxicidade para determinar a dose letal para cem por cento dos animais e o menor nível no qual não se observa efeitos adversos. Segundo o formulário unificado serão alocados 15 peixes por aquário. No ensaio preliminar os peixes ficarão expostos ao antibiótico por 24 horas. Na sequência será realizado teste de exposição controlada dos animais ao antibiótico e aos seus AOPs. Neste ensaio os animais ficarão expostos por 96 horas ao antibiótico ou aos seus AOPs, sendo três tratamentos diferindo quanto à concentração do antibiótico e três tratamentos diferindo quanto à concentração de AOPs. As concentrações utilizadas estarão dentro da faixa para a qual não se observou nenhum efeito adverso no estudo preliminar. Serão empregados 15 animais para cada tratamento e cada grupo de 15 animais será exposto a um único tratamento. Após a exposição os peixes serão anestesiados com benzocaína 5% dissolvida na água e mortos por retirada do fígado, cérebro e músculos. Haverá também um grupo de controle negativo que não será exposto ao antibiótico ou aos seus AOPs.</p>	

ANEXO A - Parecer CEUA (Parte 2)



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
Câmpus Dois Vizinhos
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA



<p>Objetivo:</p> <p>Segundo o formulário unificado apresentado o estudo tem como objetivo "Avaliar a ecotoxicidade de fármacos (antes e após tratamento por processos avançados de oxidação) em peixes (<i>Astyanax sp</i>), através de biomarcadores bioquímicos".</p>
<p>Avaliação dos Riscos e Benefícios:</p> <p>O projeto apresenta como potenciais benefícios a determinação da toxicidade da rifampicina e de seus AOPs sobre <i>Astyanax sp</i>, e a avaliação da eficiência do emprego de processos avançados de oxidação para degradação deste antibiótico em produtos menos tóxicos. Por outro lado, a execução do projeto contaminará um volume considerável de água que se não for corretamente descartada poderá causar contaminação ambiental.</p>
<p>Comentários e Considerações sobre a Pesquisa / Aula Prática:</p> <p>O objetivo da pesquisa apresenta mérito científico e os pesquisadores se comprometem a seguir uma NBR que normatiza esse tipo de estudo.</p>
<p>Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:</p> <p>Todos os documentos obrigatórios foram apresentados</p>
<p>Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:</p> <p>Não há.</p>
<p>Situação do Parecer:</p> <p>APROVADO</p>
<p>Considerações Finais a Critério da CEUA:</p> <p>Não há.</p>

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "ECOTOXICIDADE DE FÁRMACOS E SUBPRODUTOS DE DEGRADAÇÃO APÓS TRATAMENTO POR PROCESSOS AVANÇADOS DE OXIDAÇÃO", protocolo nº 2015/011, sob a responsabilidade de **ADRIANE MARTINS DE FREITAS** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UTFPR) da UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ, em reunião de **13/08/2015**.

ANEXO A - Parecer CEUA (Parte 3)

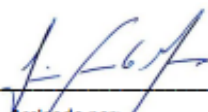


Ministério da Educação
UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
Câmpus Dois Vizinhos
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA



Vigência do projeto:	02/2015 a 02/2017
Espécie/linhagem:	<i>Astyanax sp</i>
Número de animais:	180
Peso/Idade:	Animais juvenis com 5 a 10 g de peso corporal
Sexo:	Machos e fêmeas
Origem:	Revendedor comercial

Dois Vizinhos, 21 de agosto de 2015.


Assinado por:

Luis Fernando Glasenapp de Menezes

Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Tecnológica Federal do Paraná