

MARCELA MUÑOZ PEÑUELA

Ajustes fisiológicos de *Astyanax altiparanae*  
(Teleostei: Characiformes: Characidae)  
expostos a fármacos de preocupação  
emergente

Physiological adjustments of *Astyanax*  
*altiparanae* (Teleostei: Characiformes:  
Characidae) exposed to pharmacological  
compounds of emerging concern

São Paulo  
2020

MARCELA MUÑOZ PEÑUELA

Ajustes fisiológicos de *Astyanax altiparanae*  
(Teleostei: Characiformes: Characidae) expostos  
a fármacos de preocupação emergente

Physiological adjustments of *Astyanax*  
*altiparanae* (Teleostei: Characiformes:  
Characidae) exposed to pharmacological  
compounds of emerging concern

Tese apresentada ao Instituto de  
Biociências da Universidade de São  
Paulo, como parte dos requisitos  
para obtenção do grau de Doutor em  
Ciências, Área de Fisiologia Geral.



Orientadora: Profa. Dra. Renata  
Guimarães Moreira Whitton

Coorientadora: Profa. Dra. Fabiana  
Laura Lo Nostro

São Paulo  
2020

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço de Biblioteca do Instituto de Biociências da USP, com os dados fornecidos pela autora.

Muñoz-Peñuela, Marcela.

Ajustes fisiológicos de *Astyanax altiparanae* (Teleostei: Characiformes : Characidae) expostos a fármacos de preocupação emergente / Marcela Muñoz-Peñuela; orientadora Renata Guimarães Moreira Whitton -- São Paulo, 2020.

168 f.

Tese (Doutorado) -- Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Fisiologia Geral.

1. Caféina. 2. Diclofenaco. 3. Exposição Aguda. Exposição Subcrônica. 4. Reservatórios Poluídos. 5. Teleósteos. I. Whitton, Renata Guimarães Moreira. II. Título.

Bibliotecária responsável pela catalogação: Elisabete da Cruz Neves. CRB - 8/6228.

## Comissão Julgadora:

---

Prof(a). Dr(a).

---

Prof(a). Dr(a).

---

Prof(a). Dr(a).

---

Prof(a). Dr(a).  
Orientadora

# AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Renata Guimarães Moreira Whitton, pelo seu apoio incondicional ao longo desses anos de trabalho e sobretudo pela amizade e incluir-me na sua família.

À minha coorientadora, Profa. Dra. Fabiana L. Lo Nostro, pela atenção dispensada ao meu projeto, pelos incentivos e pela amizade e carinho.

Aos meus grandes amigos Aline e Kadu, que sem eles, este trabalho jamais teria sido pensado e nem desenvolvido. Além de ser minha família no Brasil.

Ao técnico do LAMEROA, Vagner Alberto por sua amável disponibilidade para solucionar todos os problemas técnicos que apareciam, sempre de surpresa.

Aos meus amigos João e Giovana, pelas sugestões e comentários que ajudaram a melhorar este trabalho.

À equipe do LAMEROA pelo acompanhamento durante as coletas.

Aos meus pais que são as pessoas que mais confiam em mim e sempre me incentivam à alcançar minhas metas.

Aos meus irmãos que sempre estão me dando força diante das dificuldades da vida.

Às minhas famílias brasileiras (extensão da Renata e Aline) que me brindaram com apoio durante os meus anos no Brasil e jamais permitiram que me sentisse sozinha.

Ao CNPq pela bolsa de doutorado, e à FAPESP e à CAPES pelo financiamento do projeto.

À Estação de Hidrobiologia e Aquicultura de Paraibuna (anteriormente pertencente à Companhia Energética de São Paulo – CESP), especialmente a Danilo Caneppele, por ceder os peixes dos experimentos.

Ao Laboratório de Ecofisiologia Animal (UEL-Londrina/PR), especialmente à Profa. Dra. Claudia B. Martinez, pelo treinamento das técnicas de genotoxicidade.

Ao Laboratório de Evolução e Desenvolvimento de Invertebrados (IB-USP), especialmente ao Prof. Dr. Federico Brown, por permitir a utilização do microscópio de fluorescência.

E a todos os que contribuíram para meu crescimento pessoal e profissional durante o doutorado.

## ÍNDICE

|                                                                                                                                                                                                        |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Resumo</b>                                                                                                                                                                                          | 01 |
| <b>Abstract</b>                                                                                                                                                                                        | 02 |
| <b>Introdução Geral</b>                                                                                                                                                                                | 03 |
| <b>Capítulo 1.</b> O diclofenaco e a cafeína inibem as enzimas do sistema antioxidante hepático no peixe de água doce <i>Astyanax altiparanae</i> (Teleostei: Characiformes)                           | 10 |
| Abstract/Resumo                                                                                                                                                                                        | 10 |
| 1. Introdução                                                                                                                                                                                          | 12 |
| 2. Materiais e Métodos                                                                                                                                                                                 | 15 |
| 3. Resultados                                                                                                                                                                                          | 21 |
| 4. Discussão                                                                                                                                                                                           | 25 |
| 5. Conclusão                                                                                                                                                                                           | 30 |
| Agradecimentos                                                                                                                                                                                         | 30 |
| Referências                                                                                                                                                                                            | 31 |
| <b>Capítulo 2.</b> Respostas neurotóxicas, antioxidantes e genotóxicas em machos de <i>Astyanax altiparanae</i> (Teleostei, Characidae) expostos a concentrações ambientalmente relevantes de fármacos | 39 |
| Abstract/Resumo                                                                                                                                                                                        | 39 |
| 1. Introdução                                                                                                                                                                                          | 41 |
| 2. Materiais e Métodos                                                                                                                                                                                 | 45 |
| 3. Resultados                                                                                                                                                                                          | 51 |
| 4. Discussão                                                                                                                                                                                           | 55 |
| 5. Conclusão                                                                                                                                                                                           | 61 |
| Agradecimentos                                                                                                                                                                                         | 62 |
| Referências                                                                                                                                                                                            | 62 |
| <b>Capítulo 3.</b> Alterações bioquímicas e genotóxicas de <i>Astyanax altiparanae</i> (Teleostei, Characidae) em reservatórios poluídos                                                               | 70 |

|                                     |            |
|-------------------------------------|------------|
| Abstract/Resumo                     | 70         |
| 1. Introdução                       | 73         |
| 2. Materiais e Métodos              | 76         |
| 3. Resultados                       | 83         |
| 4. Discussão                        | 90         |
| 5. Conclusão                        | 98         |
| Agradecimentos                      | 99         |
| Referências                         | 99         |
| <b>Discussão Geral e Conclusões</b> | <b>107</b> |
| <b>Referências Bibliográficas</b>   | <b>112</b> |
| <b>Anexos</b>                       | <b>118</b> |

## RESUMO

A poluição por compostos provenientes da indústria farmacêutica vem gerando recentemente preocupação. Apesar de, na maioria dos casos, as concentrações relatadas em ecossistemas aquáticos serem baixas ( $\text{ng L}^{-1}$  a  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) estas podem causar efeitos toxicológicos sobre os organismos aquáticos. As represas Guarapiranga e Billings, localizadas na região sul da capital paulista, são caracterizadas por uma intensa ação antrópica, onde já foram reportadas concentrações de diferentes fármacos em quantidades que se encontram na faixa de  $\text{ng L}^{-1}$ , dentre os quais se encontram o diclofenaco (DCF) e a cafeína (CAF). O presente estudo avaliou os efeitos tóxicos de ambos os fármacos em machos adultos de *Astyanax altiparanae* em bioensaios em laboratório, onde foram analisados os efeitos combinados e de forma separada dos dois compostos, utilizando diferentes biomarcadores relacionados com estresse oxidativo e genotoxicidade; assim como a atividade da acetilcolinesterase (AChE) e ciclooxigenase (COX). Os mesmos biomarcadores (com exceção da AChE e COX) foram utilizados em fêmeas adultas da mesma espécie em diferentes braços das Represas Guarapiranga (Embu-Guaçu, Barragem e Aracati) e Billings (Bororé e Pedreira), com diferentes níveis de eutrofização, no inverno e no verão. No bioensaio agudo, não foi possível evidenciar alteração na atividade das enzimas AChE e COX; porém, na exposição subcrônica ambos os fármacos, separados ou combinados, inibiram a AChE no músculo dos peixes, e só os tratamentos com DCF inibiram a atividade da COX. Em ambos os bioensaios, houve tendência à inibição das enzimas antioxidantes hepáticas, principalmente sob exposição ao DCF; porém na exposição aguda à CAF também houve efeito inibitório de algumas enzimas. Diferentemente do bioensaio agudo, a exposição subcrônica à CAF não mostrou efeito nas enzimas antioxidantes branquiais ou hepáticas; porém, no bioensaio agudo, a CAF gerou lipoperoxidação (LPO) hepática. Já no bioensaio subcrônico, só foi observada LPO hepática nos animais expostos à mistura dos fármacos, observando um efeito potencializador. Diferentemente dos bioensaios, foi observada maior atividade das enzimas antioxidantes nos animais de campo coletados nos pontos de maior poluição. Ainda no campo foi possível verificar uma influência sazonal nas respostas fisiológicas, permitindo sugerir que os peixes estão sob maior estresse ambiental durante o inverno em comparação ao verão. Nos bioensaios agudo e subcrônico, assim como no campo, as brânquias apresentam baixa resposta de atividade das enzimas antioxidantes e LPO quando expostas aos xenobióticos, quando comparadas às respostas hepáticas. Finalmente, os biomarcadores de genotoxicidade se alteraram nas exposições subcrônicas e no campo, sem variações na exposição aguda. No ensaio subcrônico, a exposição à CAF gerou danos genotóxicos, e no campo, os animais da Pedreira (ponto mais poluído) apresentaram maior genotoxicidade. Este estudo abordou os efeitos dos poluentes no ambiente natural, mas entendendo a necessidade de avaliar a ação específica de alguns compostos de preocupação emergente de origem antrópica em bioensaios, considerando que estes compostos afetam o equilíbrio da fauna aquática em reservatórios de São Paulo.

**Palavras-chave:** cafeína, diclofenaco, exposição aguda, exposição subcrônica, reservatórios poluídos, teleósteos.

## ABSTRACT

Pollution by pharmaceutical compounds has recently raised concerns. Although, in most cases, the reported concentrations in aquatic ecosystems are low ( $\text{ng L}^{-1}$  to  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), they can cause toxicological effects on aquatic organisms. The Guarapiranga and Billings reservoirs, located in the southern region of the capital of São Paulo, are characterized by an intense anthropic action, where concentrations of different drugs have been reported in the range of  $\text{ng L}^{-1}$ , being diclofenac (DCF) and caffeine (CAF) among them. The present study evaluated the toxic effects of both drugs in *Astyanax altiparanae* adult males in laboratory bioassays, where the combined and separate effects of both compounds were analyzed, using different biomarkers related to oxidative stress and genotoxicity; as well as the activity of acetylcholinesterase (AChE) and cyclooxygenase (COX) enzymes. The same biomarkers (with the exception of AChE and COX) were also analyzed in adult females of this species sampled from different branches of the Guarapiranga (Embu-Guaçu, Barragem and Aracati) and Billings (Bororé and Pedreira) reservoirs, with different levels of eutrophication, during winter and summer seasons. In the acute bioassay, no evident changes in the activity of the AChE and COX enzymes were observed; however, in subchronic exposure both drugs, separately or combined, inhibited AChE in muscle; and COX was inhibited by DCF. In both bioassays, a tendency towards inhibition of hepatic antioxidant enzymes was found, mainly under exposure to DCF and under acute exposure to CAF, and the latter also caused hepatic lipoperoxidation (LPO). In the subchronic bioassay, hepatic LPO was only observed in animals exposed to the mixture of drugs, observing a potentiating effect. Higher activities of antioxidant enzymes were observed in the field animals collected at the points of greatest pollution. A seasonal influence on the physiological responses was detected, suggesting that fish are under greater environmental stress during the winter compared to the summer. In both acute and subchronic bioassays, as well as in the field, gills exhibited a low response in the activity of antioxidant enzymes and LPO when exposed to xenobiotics, when compared to liver responses. Genotoxicity biomarkers were altered in subchronic exposure and field samples, with no changes due to acute exposure. Subchronic exposure to CAF caused genotoxic damage, whereas only field animals from Pedreira (the most polluted point sampled) showed greater genotoxicity than fish at other sampling sites. This study carried out an approach to the effects of pollutants on the natural environment, but understanding the need to evaluate the specific action of some compounds of emerging concern of anthropic origin in bioassays, considering that these compounds affect the aquatic fauna balance in São Paulo reservoirs.

**Keywords:** acute exposure, caffeine, diclofenac, polluted reservoirs, subchronic exposure, teleost.



## INTRODUÇÃO GERAL

A Região Metropolitana de São Paulo (RMSP) é um dos maiores complexos urbanos e industriais da América do Sul, que integra 39 municípios e cerca de 20 milhões de habitantes (PDUI, 2016). Nesta região se concentra o crescimento econômico do Brasil (Bógus e Pasternak, 2019), o que tem gerado a construção de várias barragens para suprir as necessidades de água e energia para todas as atividades antrópicas, sendo os reservatórios Billings e Guarapiranga dois dos principais (Cardoso-Silva et al., 2014; Shihomatsu et al., 2017). Ambos os reservatórios fazem parte da bacia do Alto Tietê e são impactados pelo desmatamento, erosão do solo, atividades agrícolas e industriais e assentamentos regulares e irregulares (Almeida e Weber, 2005; López-Doval et al., 2017). Desta forma, a qualidade da água destes reservatórios tem sido comprometida, e já tem sido relatada a presença de compostos como pesticidas (carbendazim, fipronil, tebuconazol), fármacos (acetaminofeno, atenolol, cafeína, diclofenaco, ibuprofeno), hormônios ( $17\alpha$ -etinilestradiol,  $17\beta$ -estradiol), drogas ilícitas (benzoilecgonina, cocaína) e plastificantes (bisfenol A, dibutilftalato), dentre outros (Almeida e Weber, 2005; López-Doval et al., 2017; Shihomatsu et al., 2017; Montagner et al., 2019).

O interesse em entender os efeitos causados pela presença de compostos provenientes da indústria farmacêutica vêm aumentando nos últimos anos. Anteriormente estes compostos não eram considerados substâncias potencialmente tóxicas para o meio ambiente, mas hoje são conhecidos por seus efeitos estrogênicos, genotóxicos, cancerígenos e teratogênicos na fauna aquática (Almeida e Weber, 2005; Tejada et al., 2014; Mezzelani et al., 2019). Estes compostos são considerados atualmente como “poluentes de preocupação emergente”, pois são substâncias que ainda não possuem nenhuma regulamentação, pois seus efeitos nos seres vivos ainda não são bem conhecidos, devendo ser investigados (Sauvé e Desrosiers, 2014).

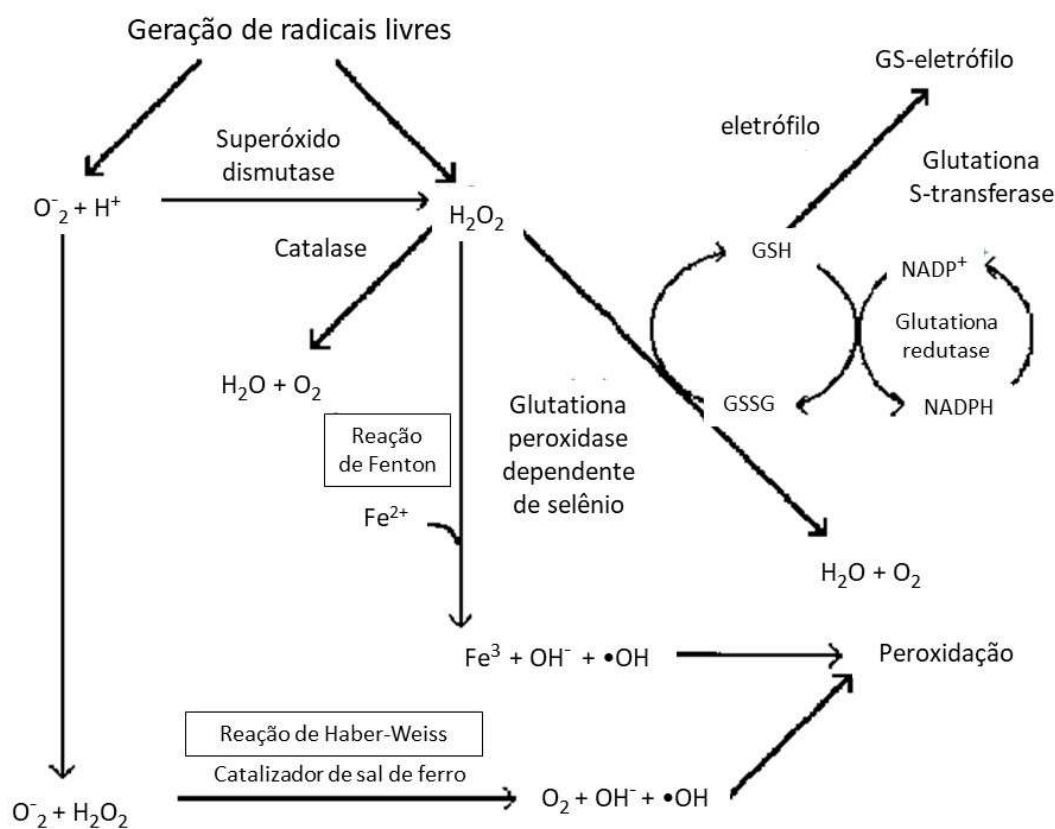
No estado de São Paulo é encontrado o maior número de estudos sobre a presença de fármacos em corpos d'água no Brasil (Quadra et al., 2017; Montagner et al., 2019), podendo-se destacar o diclofenaco (DCF) e a cafeína (CAF) como dois

dos compostos que se encontram em alta concentração (Almeida e Weber, 2005; López-Doval et al., 2017; Shihomatsu et al., 2017). Nos reservatórios acima mencionados, as maiores concentrações destes fármacos são 394,5 ng L<sup>-1</sup> de DCF na Billings (Almeida and Weber, 2005) e 27,386 ng L<sup>-1</sup> de CAF na Guarapiranga (Shihomatsu et al., 2017). Na maioria dos casos, as concentrações destes compostos em ecossistemas aquáticos são muito baixas (ng L<sup>-1</sup> a µg L<sup>-1</sup>) (Almeida e Weber, 2005; Beyer et al., 2014), porém é importante ter em conta que muitas destas substâncias foram sintetizadas com o objetivo de modificar vias bioquímicas nos seres humanos em doses baixas, de modo que estas podem também causar efeitos toxicológicos sobre os organismos aquáticos (Almeida e Weber, 2005; Huerta et al., 2016). Detalhes sobre as características físicas e químicas do DCF e CAF encontram-se no Anexo 1.

Os estudos ecotoxicológicos utilizam biomarcadores para avaliar o efeito dos poluentes por meio de alterações fisiológicas, genotóxicas ou morfológicas (Kellar et al., 2014; Colin et al., 2016). Dentre os principais biomarcadores utilizados nos estudos com peixes, estão aqueles de respostas ao estresse, ao estresse oxidativo, desregulação endócrina, efeitos genotóxicos e alterações histopatológicas, dentre outros (Hook et al., 2014; Colin et al., 2016). Os antioxidantes (enzimáticos e não enzimáticos) são geralmente utilizados como bioindicadores de defesa do organismo. Dentre os antioxidantes enzimáticos mais usados, encontram-se principalmente as atividades das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx), e glutathione S-peroxidase (GST), que também é um biomarcador de detoxificação de compostos xenobioticos (Amiard-Triquet et al., 2013; Hook et al., 2014; Colin et al., 2016). As vias de geração de espécies reativas de oxigênio e as ações de algumas enzimas antioxidantes estão representadas na Figura 1.

A função principal destas enzimas antioxidantes é bloquear e desativar as espécies reativas de oxigênio (EROs) geradas principalmente no processo de metabolização dos compostos xenobióticos, para assim evitar danos oxidativos no organismo (Livingstone, 2001; Amiard-Triquet et al., 2013; Atli et al., 2016). A SOD por exemplo é a primeira enzima que atua, convertendo o ânion superóxido em

peróxido de hidrogênio, que é utilizado como substrato para as enzimas GPx e CAT (Matés, 2000; Livingstone, 2001; Amiard-Triquet et al., 2013). A GPx, diferente da CAT, usa glutatona reduzida (GSH) para reduzir diferentes tipos de peróxido, e sua atividade está relacionada com a glutatona redutase que gera GSH a partir da glutatona oxidada (GSSG) (Amiard-Triquet et al., 2013). A CAT, ao contrário, não precisa de GSH, e age quando existem danos mais severos, decompondo o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (Matés, 2000; Livingstone, 2001; Amiard-Triquet et al., 2013; Atli et al., 2016). A enzima GST por sua parte é responsável por conjugar a glutatona com os metabólitos gerados na primeira fase de desintoxicação dos organismos, produzindo compostos mais solúveis que são mais facilmente eliminados (Storey, 1996; Stepanova et al., 2013).



**Figura 1.** Vias de geração de espécies reativas de oxigênio e as ações de algumas enzimas antioxidantes (Modificado de Storey, 1996).

Estes biomarcadores são usados no entanto, em conjuntos com alguns biomarcadores indicadores de dano, pois quando os níveis de estresse sobrepõem os sistemas de defesas dos organismos, podem ser produzidos danos a moléculas de grande importância biológica como os lipídios, proteínas e DNA (Livingstone, 2001; Amiard-Triquet et al., 2013). Sendo assim, a medição dos níveis de lipoperoxidação (LPO), junto com biomarcadores de genotoxicidade é uma prática comumente utilizada em estudos ecotoxicológicos (Amiard-Triquet et al., 2013; Hook et al., 2014; Colin et al., 2016). A peroxidação lipídica envolve a quebra de ácidos graxos polinsaturados induzindo danos estruturais e químicos nas membranas celulares (Livingstone, 2001; Amiard-Triquet et al., 2013). Durante o processo da lipoperoxidação ocorre a formação de diferentes compostos e o dano à membrana pode ser avaliado na fase intermediária do processo (método FOX; Hermes-Lima et al., 1995) ou na fase final do processo (método de TBARS; Amiard-Triquet et al., 2013).

Os métodos mais utilizados para avaliar os danos no DNA são o ensaio de eletroforese em gel de uma única célula (também conhecido como ensaio de cometa), o teste de micronúcleo (MN) e o teste de anormalidades nucleares em eritrócitos (ANE) (Rocco et al., 2011; Colin et al., 2016). O teste cometa permite medir as quebras no DNA mediante a migração (durante a eletroforese) do DNA danificado do núcleo, gerando uma forma de um cometa, com o DNA intacto na cabeça, enquanto o DNA fragmentado se observa espalhado na cauda (Amiard-Triquet et al., 2013). Os MN são originados a partir de fragmentos cromossômicos ou cromossomos inteiros que surgem como resultado de quebras cromossômicas após ação clastogênica ou por cromossomos inteiros que não migram durante a anáfase como resultado de efeitos aneugênicos (Galindo e Moreira, 2009; Braham et al., 2017; Amiard-Triquet et al., 2013). A fragmentação do DNA, avaliada pelo teste cometa, pode ocorrer de forma rápida, mas transitória, sendo possível a ocorrência de reparos, enquanto os danos avaliados mediante o teste do MN são irreversíveis, e duram até a morte celular (Amiard-Triquet et al., 2013). Com relação às ANE, que são alterações na membrana nuclear, as vias exatas que levam à indução destas ainda não são bem compreendidas, mas da mesma forma que os

MN, são danos irreversíveis (Braham et al., 2017). Essas questões serão discutidas em mais detalhes no decorrer da tese.

Outros biomarcadores, como o caso da atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE), permitem avaliar efeitos tóxicos em outras vias dos organismos, permitindo neste caso específico, avaliar a neurotoxicidade por exposição a compostos xenobióticos. A função principal da AChE é regular a neurotransmissão colinérgica catalisando a hidrólise da acetilcolina na junção neuromuscular nos sistemas nervoso central e periférico (Taylor et al., 2009). A acetilcolina é um neurotransmissor presente no sistema nervoso central e periférico, responsável pela transmissão de sinais dos neurônios às glândulas terminais e músculos (Pohanka e Dobes, 2013). Desta forma, em muitos casos é possível avaliar biomarcadores mais específicos para determinado composto, como no caso da atividade da enzima ciclooxigenase (COX) quando existe exposição aos antiinflamatórios não esteroideais, que têm como mecanismo de ação a inibição desta enzima (Flippin et al., 2007). A função principal da COX é catalisar a formação de moléculas inflamatórias como prostaglandinas, tromboxanos e levuloglandinas (Fitzpatrick, 2004), e sua inibição por tempo prolongado, poderia comprometer o sistema imune dos organismos.

Apesar dos diferentes estudos realizados na área de ecotoxicologia, ainda existem alguns aspectos a serem investigados com a finalidade de obter dados mais realistas sobre os legítimos efeitos dos poluentes na fisiologia dos organismos. Um deles é a realização de estudos nos quais os resultados de campo sejam validados em bioensaios, pois poucos estudos têm combinado as análises no meio ambiente e no laboratório, sendo difícil evidenciar os efeitos específicos reais dos poluentes (Kellar et al., 2014; Colin et al., 2016). Outro aspecto é a realização de análises dos efeitos de diferentes compostos combinados, nas quais a interação de dois ou mais compostos seja analisada, dado que os organismos em ambientes contaminados são expostos a uma mistura de produtos químicos (Beyer et al., 2014).

Com base no exposto, o presente estudo teve como objetivo utilizar biomarcadores de estresse oxidativo e genotoxicidade, assim como de neurotoxicidade (AChE) e a atividade da COX (como biomarcador específico do

DCF), como indicadores das respostas de machos adultos do lambari-do-rabão-amarelo, *Astyanax altiparanae*, ao DCF e à CAF para avaliar os efeitos isolados e combinados destas substâncias em bioensaios no laboratório, de forma aguda (capítulo 1) e subcrônica (capítulo 2). Utilizando-se os mesmos biomarcadores (com exceção da AChE e COX), foram avaliados os ajustes fisiológicos desta mesma espécie à presença de contaminantes em pontos com diferentes graus de poluição nos reservatórios Guarapiranga e Billings, no inverno e verão (capítulo 3).

Esta espécie foi selecionada devido à sua abundância e ampla distribuição nos locais de estudo. É uma espécie que habita locais com diferentes níveis tróficos (Alonso et al., 2019), apresenta importância econômica, sendo utilizada na pesca esportiva para consumo humano (Bertolucci et al., 2008), e tem importância ecológica por ser parte da cadeia alimentar (Marceniuk e Hilsdorf, 2010). Adicionalmente, *A. altiparanae* tem sido considerada sensível para avaliar biomarcadores que permitam monitorar a qualidade de corpos d'água (Vieira et al., 2017; Calado et al., 2019; Francisco et al., 2019; Marques et al., 2020). Lucena e Soares (2016) propuseram uma alteração do nome da espécie para *Astyanax lacustris*, porém, como a sistemática do gênero *Astyanax* é muito complexa, esta alteração ainda está sendo avaliada pela comunidade científica, motivo pelo qual no presente trabalho foi mantida a classificação anterior (Garutti e Britski, 2000).

As seguintes hipóteses foram estabelecidas para o capítulo 1 e 2:

- Animais expostos à cafeína e/ou diclofenaco, em bioensaio agudo e subcrônico apresentam diminuição na atividade da AChE;
- Animais expostos ao diclofenaco em bioensaio agudo e subcrônico apresentam diminuição na atividade da COX;
- Animais expostos à cafeína e/ou diclofenaco em bioensaio agudo e subcrônico apresentam uma maior lipoperoxidação e danos genotóxicos;
- A exposição aos dois fármacos simultaneamente desencadeia efeitos mais potentes nos biomarcadores avaliados, comparados à exposição dos fármacos separadamente.

As seguintes hipóteses foram estabelecidas para o capítulo 3:

- Os peixes que habitam reservatórios mais impactados apresentam aumento da atividade nas enzimas antioxidantes quando comparados com aqueles que habitam reservatórios menos impactados;

- Os peixes que habitam reservatórios mais impactados, apresentam uma maior lipoperoxidação e danos genotóxicos quando comparados com aqueles que habitam reservatórios menos impactados.

Conseqüentemente, os objetivos gerais de cada capítulo foram:

Capítulo 1. Avaliar os efeitos do DCF e da CAF em exposição aguda, de forma isolada ou combinados, em machos adultos de *A. altiparanae*.

Capítulo 2. Avaliar os efeitos do DCF e da CAF em exposição subcrônica, de forma isolada ou combinados, em machos adultos de *A. altiparanae*.

Capítulo 3. Avaliar as alterações bioquímicas e genotóxicas de fêmeas adultas de *A. altiparanae* em reservatórios poluídos da RMSP em duas estações do ano.

## CAPÍTULO 1

Artigo publicado: *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*  
<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2020.108910>

### **O diclofenaco e a cafeína inibem as enzimas do sistema antioxidante hepático no peixe de água doce *Astyanax altiparanae* (Teleostei: Characiformes)**

Marcela Muñoz-Peñuela<sup>a\*</sup>, Fabiana Laura Lo Nostro<sup>b</sup>, Aline Dal'Olio Gomes<sup>a</sup>, Carlos Eduardo Tolussi<sup>c</sup>, Giovana Souza Branco<sup>a</sup>, João Paulo Silva Pinheiro<sup>a</sup>, Filipe Guilherme Andrade de Godoi<sup>a</sup>, Renata Guimarães Moreira<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Fisiologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. Rua do Matão, Trav.14, n° 321, 05508-090 São Paulo, SP, Brazil

<sup>b</sup> Laboratorio de Ecotoxicología Acuática, Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires & IBBEA, CONICET-UBA. Ciudad Universitaria (C1428EHA), Buenos Aires, Argentina

<sup>c</sup> Universidade Anhembi-Morumbi, Campus Mooca, São Paulo SP, Brazil

\*marce8407@gmail.com

#### **Abstract**

Although concentrations of pharmaceutical compounds in aquatic ecosystems are low, they can cause toxic effects on organisms. The aim of this study was to evaluate the effects of diclofenac (DCF), a non-steroidal anti-inflammatory drug, and caffeine (CAF), a central nervous system stimulant, both alone or combined, in *Astyanax altiparanae* males under acute exposure (96 h), measuring neurotoxicity biomarkers, antioxidant response and damage at biochemical and cellular levels. DCF concentration in water, separated and combined, was 3.08 mg L<sup>-1</sup> and that of CAF was 9.59 mg L<sup>-1</sup>. To assess neurotoxicity, brain and muscle acetylcholinesterase (AChE) activities were measured. To evaluate oxidative stress, the enzymatic activities of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), catalase (CAT) and glutathione S-transferase (GST), as well as



lipoperoxidation (LPO), were analyzed in liver and gills. Activity of hepatic cyclooxygenase (COX) was also evaluated. Genotoxicity was assessed in blood using comet assay and micronucleus test, as well as nuclear abnormalities. DCF and CAF, alone or combined, had neither effect on AChE activity, nor in the activity of SOD, CAT, GPx and GST in gills. In liver, DCF inhibited SOD and GPx activity, CAF inhibited CAT activity, the mixture inhibited SOD and GST activity; although only animals exposed to CAF showed increased hepatic LPO. Under these experimental conditions, no effect on COX activity was observed, nor cytotoxic and genotoxic damage. The most pronounced effects were caused by the drugs separately, since both compounds altered the enzymes, but only CAF triggered LPO, showing more harmful effects.

**Keywords:** drugs, genotoxicity, lipoperoxidation, oxidative stress, water pollution

## Resumo

Atualmente as concentrações de fármacos relatadas em ecossistemas aquáticos são muito baixas ( $\text{ng L}^{-1}$  a  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), embora sabe-se que estas substâncias podem causar efeitos tóxicos sobre os organismos aquáticos. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do diclofenaco (DCF), um anti-inflamatório não esteroidal, e da cafeína (CAF), um estimulante do sistema nervoso central, isolados ou combinados, em machos de *A. altiparanae* em bioensaio de exposição aguda (96 h), sobre alguns biomarcadores de neurotoxicidade, resposta antioxidante e danos bioquímico e celular. A concentração de DCF na exposição aguda tanto separada como combinada foi  $3,08 \text{ mg L}^{-1}$  e para CAF foi  $9,59 \text{ mg L}^{-1}$ , as quais correspondem ao 10% do  $\text{CL}_{50}$  para esta espécie. Para avaliar a neurotoxicidade foi medida a atividade da acetilcolinesterase (AChE) cerebral e muscular, e adicionalmente foi avaliada a influência dos fármacos na ação da cicloxigenase (COX) hepática. Para avaliar a ocorrência de estresse oxidativo, foram caracterizadas as atividades enzimáticas hepática e branquial da superóxido dismutase (SOD), glutaciona peroxidase (GPx), catalase (CAT) e glutaciona S-

transferase (GST), assim como a lipoperoxidação (LPO). A genotoxicidade no sangue foi avaliada pelos testes cometa e de micronúcleo, assim como as anormalidades nucleares. Os resultados evidenciaram que o DCF e a CAF, separados ou combinados, não tiveram efeito sobre a atividade da AChE em nenhum órgão, assim como sobre a atividade da SOD, CAT, GPx e GST nas brânquias. No fígado, o DCF inibiu a atividade da SOD e GPx, a CAF inibiu a atividade da CAT, enquanto a mistura dos fármacos inibiu a atividade da SOD e da GST, embora apenas os animais expostos à CAF tenham apresentado LPO hepática. Nestas condições experimentais, não foi observado nenhum efeito sobre a atividade da COX, assim como também os animais não apresentaram danos citotóxicos e genotóxicos. Os efeitos mais pronunciados foram causados pelos medicamentos separadamente, uma vez que ambos os compostos alteraram as enzimas, mas apenas o CAF desencadeou a LPO, apresentando efeitos mais deletérios.

**Palavras-chave:** estresse oxidativo, fármacos, genotoxicidade, lipoperoxidação, poluição aquática

### **Highlights**

- \* O diclofenaco e a cafeína inibem as enzimas do sistema antioxidante hepático de *A. altiparanae*.
- \* A cafeína promove a lipoperoxidação hepática em *A. altiparanae*.
- \* A cafeína e o diclofenaco não causam genotoxicidade em *A. altiparanae*.
- \* A cafeína e o diclofenaco não alteram as enzimas de estresse oxidativo nas brânquias em *A. altiparanae*.

## **1. Introdução**

A poluição dos corpos de água doce é um problema que tem atraído o interesse da comunidade científica há várias décadas, porém nos últimos anos a

poluição por compostos provenientes da indústria farmacêutica começou a gerar preocupação, pois anteriormente estes compostos não eram considerados substâncias potencialmente tóxicas para o meio ambiente, mas hoje são conhecidos por seus efeitos estrogênicos, genotóxicos, cancerígenos e teratogênicos para as populações aquáticas (Tejada et al., 2014; Bing-Shu et al., 2017).

Dentre os principais fármacos presentes nos corpos de água encontram-se os anti-inflamatórios não esteroides (NSAIDs), como o diclofenaco (DCF), que tem a função principal de inibir a enzima cicloxigenase (COX), que atua na síntese de prostaglandinas envolvidas nos processos inflamatórios (Hoeger et al., 2005; Bing-Shu et al., 2017). Alguns estudos vêm demonstrando que o DCF é um dos anti-inflamatórios mais consumidos no mundo e um dos mais encontrados no ambiente aquático (Bing-Shu et al., 2017). Além disso, mesmo nos locais em que existem estações de tratamento de água para esta molécula, tem sido observado que a eficiência de remoção do DCF é de apenas 40% (Almeida and Weber, 2005; Cherik et al., 2015).

Considerando o exposto, vários estudos vêm classificando o DCF como um dos fármacos mais tóxicos para os organismos aquáticos em todos os níveis tróficos (Bing-Shu et al., 2017), provocando alterações citológicas em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) (5, 20, 100 e 500  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) (Schwaiger et al., 2004); estresse oxidativo em carpa comum (*Cyprinus carpio*) (7,098  $\text{mg L}^{-1}$ ) (Islas-Flores et al., 2013) e traíra (*Hoplias malabaricus*) (administrado via alimento: 0,2, 2 and 20  $\mu\text{g Kg}^{-1}$ ) (Guiloski et al., 2015); alterações no desenvolvimento embrionário de *zebrafish* (*Danio rerio*) (1,5, 2,9, 5,9, 11,9 and 23,7  $\text{mg L}^{-1}$ ) (van den Brandhof and Montforts, 2010), além de efeito de desregulação endócrina no lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*) (4,4  $\text{mg L}^{-1}$ ) (Godoi et al., 2020). Desta forma, considerando as evidências de sua alta toxicidade, a Comissão Europeia (2012) incluiu o DCF como uma substância perigosa prioritária, determinando 100  $\text{ng L}^{-1}$  como a concentração máxima permitida na água (Acuña et al., 2015).

Além dos NSAIDs, outra classe de substância/fármaco presente abundantemente nos corpos hídricos é a dos estimulantes, como a cafeína (CAF).

Esse fármaco é utilizado como um estimulante cardíaco, cerebral e das vias respiratórias, além de ser comumente consumido em produtos como café, chá e chocolate (Moore et al., 2008; Lee and Wang, 2015). Dentro dos principais mecanismos de ação da CAF estão o antagonismo dos receptores de adenosina, mobilização do cálcio intracelular e a inibição das fosfodiesterases (Cappelletti et al., 2015; Nehlig et al., 1992). A presença da CAF nos corpos de água também tem sido amplamente relatada em virtude da sua alta solubilidade e difícil eliminação nas estações de tratamento de água (Oliveira et al., 2015).

No entanto, as informações existentes sobre seus efeitos nos ecossistemas aquáticos são ainda incipientes (Moore et al., 2008) e muitas informações são necessárias sobre as consequências da poluição por cafeína. Alguns estudos recentes têm mencionado a bioacumulação da CAF no peixe mosquito (*Gambusia holbrooki*) ( $1,3 \text{ ng g}^{-1}$ ) (Wang and Gardinali, 2012), interferência no desenvolvimento de embriões e larvas do vairão (*Pimephales promelas*) ( $50 \text{ mg L}^{-1}$ ) (Moore et al., 2008) e do peixe medaka (*Oryzias latipes*) ( $10 \text{ and } 100 \text{ mg L}^{-1}$ ) (Lee and Wang, 2015), assim como desregulador endócrino no lambari-do-rabo-amarelo (*A. altiparanae*) ( $12,8 \text{ mg L}^{-1}$ ) (Godoi et al., 2020).

A presença de ambos fármacos tem sido amplamente relatada nos corpos de água superficiais no mundo, com concentrações médias de 21 a  $722 \text{ ng L}^{-1}$  para o DCF (Acuña et al., 2015), e entre 2 e  $1600 \text{ ng L}^{-1}$  para a CAF (Capolupo et al., 2016). No Brasil, tem sido reportada a presença de ambos os fármacos em alguns corpos de água (Starling et al., 2019), com concentrações de até  $394,5 \text{ ng L}^{-1}$  de DCF (Almeida and Weber, 2005) e  $27386 \text{ ng L}^{-1}$  de CAF (Shihomatsu et al., 2017) em reservatórios da Região Metropolitana de São Paulo.

Alguns estudos mencionados anteriormente já descreveram o efeito desses fármacos de forma isolada em algumas espécies de teleósteos, entretanto poucos estudos avaliaram os efeitos toxicológicos da mistura destes dois compostos, o qual é relevante, considerando-se que os organismos aquáticos são constantemente expostos a misturas de poluentes, que podem ter um efeito completamente diferente dos compostos isolados (Shi et al., 2019). Em peixes foi reportado até o momento que a mistura do DCF e CAF gera um aumento no índice gonadossomático (IGS)

em machos adultos de *A. altiparanae*, em comparação com a exposição isolada destes fármacos. Estes mesmos animais, quando expostos a estes compostos isolados apresentaram uma redução na concentração plasmática de 17 $\beta$ -estradiol, e a exposição ao DCF também reduziu os níveis plasmáticos de testosterona (Godoi et al., 2020), evidenciando que a ação isolada e combinada difere na resposta da fisiologia endócrina nestes animais, pois quando combinados não apresentaram efeitos de desregulação endócrina.

No presente estudo, *Astyanax altiparanae* foi utilizado como modelo devido à sua plasticidade em diferentes condições ambientais, por possuir tamanho adequado para a manutenção em aquários e ser de fácil manejo em laboratório, além de ter sido utilizado como modelo em outros estudos ecotoxicológicos (Kida et al., 2016; Abdalla et al., 2019; Pinheiro et al., 2019, 2020; Godoi et al., 2020). Além disso, esta espécie é amplamente distribuída na América do Sul (Garutti e Britski, 2000), sendo abundante e uma das mais representativas nos reservatórios da RMSP, onde outros estudos foram realizados (Gomes et al., 2015; 2016; Tolussi et al., 2018; Marques et al., 2020). Além disso, esses reservatórios urbanos foram impactados por intensas ações antropogênicas, sendo a CAF e o DCF, dois dos principais fármacos encontrados na água nesses ambientes (López-Doval et al., 2017; Quadra et al., 2017).

Com base no exposto, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do diclofenaco (DCF), um antiinflamatório não esteroide, e da cafeína (CAF), um estimulante do sistema nervoso central, de forma isolada e combinada, em machos adultos de *Astyanax altiparanae* sob exposição aguda (96 h), medindo biomarcadores de neurotoxicidade, resposta antioxidante e danos em níveis bioquímicos e celulares.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1. Fármacos**

Os fármacos diclofenaco sódico (D6899) (pureza  $\geq 98\%$ ) e cafeína (C0750) (pureza  $\geq 98\%$ ) foram obtidos na Sigma Aldrich® (St. Louis, MO, USA). As soluções foram preparadas utilizando os fármacos diluídos em água deionizada com o auxílio de um agitador magnético seguindo as instruções do fabricante. Todas as soluções foram preparadas no momento da utilização, consoante com as concentrações necessárias para os diferentes grupos experimentais.

## 2.2. Desenho experimental

Machos adultos de *A. altiparanae* (MT:  $14,76 \pm 6,70$  g; CL:  $10,27 \pm 1,46$  cm) foram cedidos pela Estação de Hidrobiologia e Aquicultura de Paraibuna (SP) e transportados até o Biotério de Ectotérmicos do Departamento de Fisiologia – IB/USP, onde foram mantidos antes do início dos experimentos (temperatura:  $25,3 \pm 0,26$  °C; oxigênio dissolvido:  $6,4 \pm 0,2$  mg L<sup>-1</sup>; pH:  $7,6 \pm 0,19$  e fotoperíodo: 12:12). Os animais foram alimentados diariamente *ad libitum* (32% proteína crua) e foi feita renovação da água cada 48 h.

O delineamento experimental seguiu quatro fases para a exposição dos organismos e obtenção dos respectivos dados, como na metodologia especificada em nosso trabalho prévio (Godoi et al., 2020): 1) teste de decaimento dos compostos diclofenaco (DCF) e cafeína (CAF), 2) *Range Finding Test* (RFT), 3) concentração média letal (CL<sub>50</sub>) (Detalhes no Anexo 2). Finalmente, na quarta fase foi realizado o ensaio de toxicidade aguda com a concentração subletal de 10% do valor da CL<sub>50</sub> de cada fármaco com a finalidade de analisar os efeitos dos compostos sem ocasionar a mortalidade dos indivíduos.

O teste de toxicidade aguda foi realizado por 96 horas de exposição e os parâmetros físico-químicos da água foram monitorados diariamente (temperatura:  $25,43 \pm 0,13$  °C; pH:  $7,49 \pm 0,02$  e oxigênio dissolvido:  $6,34 \pm 0,07$  mg L<sup>-1</sup>). Os animais foram privados de alimentação 24h antes do início da exposição e foram divididos nos seguintes tratamentos experimentais (n=12 por tratamento; duplicata): controle (CTR), diclofenaco (DCF: 3,08 mg L<sup>-1</sup>), cafeína (CAF: 9,59 mg L<sup>-1</sup>) e a mistura de diclofenaco e cafeína (DCF: 3,08 mg L<sup>-1</sup>+ CAF: 9,59 mg L<sup>-1</sup>). Todos os

procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética Animal da Universidade de São Paulo (Protocolo 275/2017).

A água com fármacos de todos os experimentos foi descartada em bombonas de polietileno devidamente rotuladas e entregues ao sistema de recolhimento de resíduos perigosos da Universidade de São Paulo.

### 2.3. Análise da concentração dos fármacos

A análise da concentração do medicamento em amostras de água foi realizada no Centro de Espectrometria de Massa Aplicada do Instituto de Pesquisa Energética e Nuclear da Universidade de São Paulo. As amostras de água foram coletadas (0h e 48h de exposição - após a renovação da água) no mesmo local do aquário e filtradas com filtros de 45µm (Sartorius Stedim Biotech) e armazenadas em frascos âmbar a 10 °C.

A concentração de fármacos na água foi analisada pela técnica LC –MS / MS por uma coluna 1260 (Agilent Technologies, EUA) Luna C18 HST (2) (100 × 2 mm; 2,5 µm) (Phenomenex) a 35 °C combinada com um Espectrômetro de massa 3200QTRAP (MS-MS) (ABSciex). A amostra da injeção foi de 5 µL, a taxa de fluxo do eluente foi de 220 µL min<sup>-1</sup> e a fase móvel foi de 0,1% de ácido fórmico (Grau Sigma-Aldrich LC-MS) em água ultrapura (solvente A) e 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila (Classe JT Baker LC-MS) (solvente B). Para o solvente A o equilíbrio do eluente foi de 80% e para o solvente B foi de 20% em 2,30 minutos de execução.

Os analitos foram detectados e quantificados usando o modo de ionização ESI e monitoramento de reação múltipla (MRM). A linearidade dos dois fármacos foi  $r = 0,99$ , o limite de detecção foi de 0,054 µg L<sup>-1</sup> para DCF e 1,5 µg L<sup>-1</sup> para CAF e o limite de quantificação para DCF foi de 0,18 µg L<sup>-1</sup> e para CAF foi de 5,1 µg L<sup>-1</sup>. Os dados foram registrados e processados no Analyst® 1.5.2 (ABSciex). A concentração real para DCF foi de 4,35 ± 0,40 mg L<sup>-1</sup>, para CAF foi de 11,63 ± 0,62 mg L<sup>-1</sup>, e no tratamento da mistura (DCF + CAF) foi de 3,98 ± 0,23 e 12,23 ± 0,03 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente. O detalhamento assim como os laudos das análises encontra-se no anexo 3.

## 2.4. Coleta das amostras

Ao final da exposição, os animais foram anestesiados em água com benzocaína (0,1 %) previamente diluída em 10 mL de etanol. Amostras de sangue foram coletadas através da punção da vasculatura caudal utilizando-se seringas e agulhas heparinizadas, armazenadas em microtubos com tampão de criopreservação (250 mM sacarose, 40 mM citrato trisódico, 5 % dimetil sulfoxido (DMSO), pH 7,6, ajustado com 1 M de ácido cítrico) e mantidas em nitrogênio líquido até o processamento do teste cometa (período máximo de um mês) (Evrard et al. 2010).

Paralelamente, foram realizados esfregaços com 5  $\mu$ L de sangue para as análises do teste de micronúcleo. Concomitantemente, os dados morfológicos e ponderais foram registrados e, em seguida, os animais foram eutanasiados por secção da medula espinhal na altura do opérculo (National Research Council, 2011). Após a dissecação, amostras de cérebro, filamentos branquiais, fígado e músculo branco foram coletadas e mantidas a -80 °C até o processamento.

## 2.5. Análises das atividades enzimáticas

Para as enzimas de estresse oxidativo (superóxido dismutase - SOD, catalase - CAT, glutathione peroxidase - GPx, e glutathione S-transferase - GST), amostras de fígado e filamentos branquiais foram homogeneizadas em tampão fosfato de potássio (0,1 M; pH 7,0; 1:10 w v<sup>-1</sup> para fígado e 1:5 w v<sup>-1</sup> para brânquias) e centrifugadas (15000 x g, 20 minutos, 4°C).

A atividade da SOD foi determinada seguindo o método descrito por McCord e Fridovich (1969), lendo a absorbância a 550 nm (25 °C) em um espectrofotômetro. A SOD presente na amostra inibe a redução do citocromo C fornecida pelo ânion superóxido do sistema xantina/xantina oxidase. O resultado foi expresso em U de SOD mg da proteína<sup>-1</sup>, que representa a quantidade de SOD que promove 50% de inibição da taxa de redução do citocromo C. A atividade da CAT foi quantificada de acordo com o método descrito por Beutler et al. (1975), por meio da velocidade de



decomposição de  $H_2O_2$  pela enzima. A leitura foi feita em espectrofotômetro em 240 nm (25 °C). A atividade da GPx foi quantificada de acordo com o método descrito por Hopkins and Tudhope (1973), estimando a atividade da GPx através da oxidação da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) na presença de  $H_2O_2$ , usando o espectrofotômetro em 340 nm (25 °C). A atividade da GST foi quantificada de acordo como o método descrito por Habig et al. (1974). A complexação da atividade da GSH com o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) permite que seja estimada a concentração de GSH, com leitura em espectrofotômetro em 340 nm (25 °C).

Para avaliar neurotoxicidade, amostras de cérebro e músculo foram homogeneizadas em tampão fosfato de potássio (0,1 M; pH 7,5; 1:10 w v<sup>-1</sup>) e centrifugadas (15000 x g, 20 minutos, 4°C). O sobrenadante foi utilizado para analisar a atividade da acetilcolinesterase (AChE) seguindo o método descrito por Ellman et al. (1961) e modificado por Alves-Costa et al. (2007). A atividade da AChE foi avaliada em espectrofotômetro, em 415 nm (25 °C) e expressa em nmol min<sup>-1</sup> mg proteína<sup>-1</sup>.

A concentração de proteínas totais de todos os tecidos para normalizar a atividade das enzimas (com exceção da COX) foi analisada de acordo com o método descrito por Lowry et al. (1951) utilizando como padrão a albumina sérica bovina e leitura no espectrofotômetro em 660 nm. A atividade da enzima cicloxigenase (COX) no fígado dos organismos foi analisada com o kit colorimétrico da Cayman Chemical (N°760151), de acordo com as recomendações do fabricante. A atividade foi expressa como nmol min<sup>-1</sup> mL<sup>-1</sup>. Todas as medições foram feitas em leitor de microplacas (SpectraMax 190, Molecular Devices).

## 2.6. Análise de Lipoperoxidação

A lipoperoxidação (LPO) no fígado e nas brônquias foi analisada pelo método de oxidação ferrosa/laranja de xilenol (FOX) adaptado por Hermes-Lima et al. (1995), com leitura em espectrofotômetro em 580 nm. Os hidroperóxidos lipídicos foram expressos como equivalentes de CHP g<sup>-1</sup> peso úmido.

## 2.7. Análises de genotoxicidade

O teste cometa foi realizado de acordo com o método descrito por Singh et al. (1988). 10 µL do sangue preservado foram adicionados a 120 µL de agarose de baixo ponto de fusão para homogeneização. Em seguida, foram preparadas duas lâminas por peixe previamente cobertas com agarose (1% em PBS) e submetidas aos processos de: 1) lise por 1 h a 4 °C protegida da luz em solução lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 10 % DMSO, 1 % TRITON X-100, 0,01 M lauril sarcosinato de sódio); 2) desnaturação do DNA por 30 min em tampão de eletroforese no escuro (300 mM NaOH, 100 mM EDTA, pH 13); 3) eletroforese por 20 minutos a 300 mA e a 1 V por centímetro de comprimento da cuba utilizada; 4) lavagem com solução de neutralização por três vezes (0.4 M Tris). Posteriormente, as lâminas foram fixadas em etanol absoluto por 10 minutos.

No momento da análise, foi utilizado o GelRed (Biotium) para corar e 100 células por lâmina foram contadas sob microscópio invertido de fluorescência (400 x; Leica DMI8). A classificação de cada célula foi realizada segundo Kobayashi et al. (1995): classe 0= sem danos aparente; classe 1= comprimento da cauda menor do que o diâmetro do nucleóide; classe 2= comprimento da cauda igual ao diâmetro do nucleóide; classe 3= comprimento da cauda maior do que o diâmetro do nucleóide. Os escores de cada grupo experimental foram calculados multiplicando-se o número dos nucleóides visualizados em cada classe pelo valor da classe (0, 1, 2 ou 3). Finalmente, foram somados os escores de todos os indivíduos do tratamento e divididos pelo número de indivíduos, resultando no escore médio.

O teste de micronúcleo foi realizado de acordo com o método descrito por Al-Sabti and Metcalfe (1995) e o teste de anormalidades segundo Carrasco et al. (1990). Para ambas as análises, após 24 h da realização dos esfregaços de sangue (duplicata por animal), as lâminas foram fixadas em metanol absoluto por 10 min e coradas com Giemsa (10 %). Foram examinados 2000 eritrócitos por lâmina em microscópio de luz (1000 x) (Leica DM1000, câmera fotográfica Leica DFC295, Leica Application Suite Professional software, LAS V3.6).

## 2.8. Análises estatísticas

Todos os dados foram submetidos aos testes de normalidade (Shapiro-Wilks) e homogeneidade de variância (Test de Bartlett). Para avaliar as diferenças das respostas fisiológicas entre os tratamentos experimentais foi utilizado o teste de Análise de Variância *one-way* ANOVA, seguido pelo teste de Tukey para os dados paramétricos (AChE no músculo, SOD e LPO na brânquia, SOD, GPx, CAT e GST no fígado) ou pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunns para os dados não paramétricos (AChE cérebro, GPx, CAT e GST nas brânquias, COX e LPO de fígado, teste cometa, teste de micronúcleo e anormalidades nucleares). Em todos os casos, um nível de significância de  $P < 0,05$  foi considerado como estatisticamente significativo. Foi usado GraphPad Prism 5.01 for windows (GraphPad Software Inc., San Diego, CA) para todas as análises estatísticas.

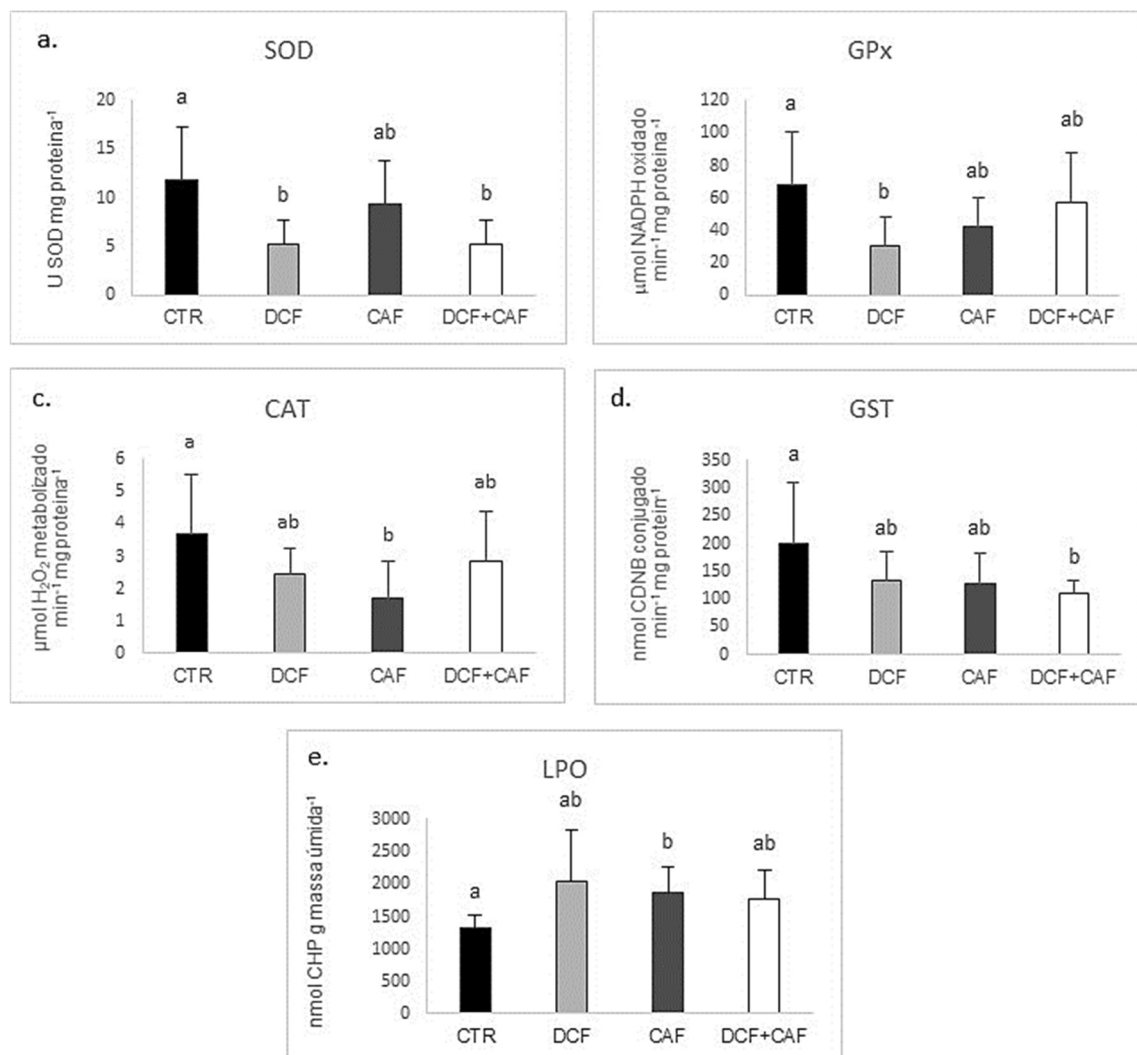
## 3. Resultados

### 3.1. Biomarcadores de estresse oxidativo

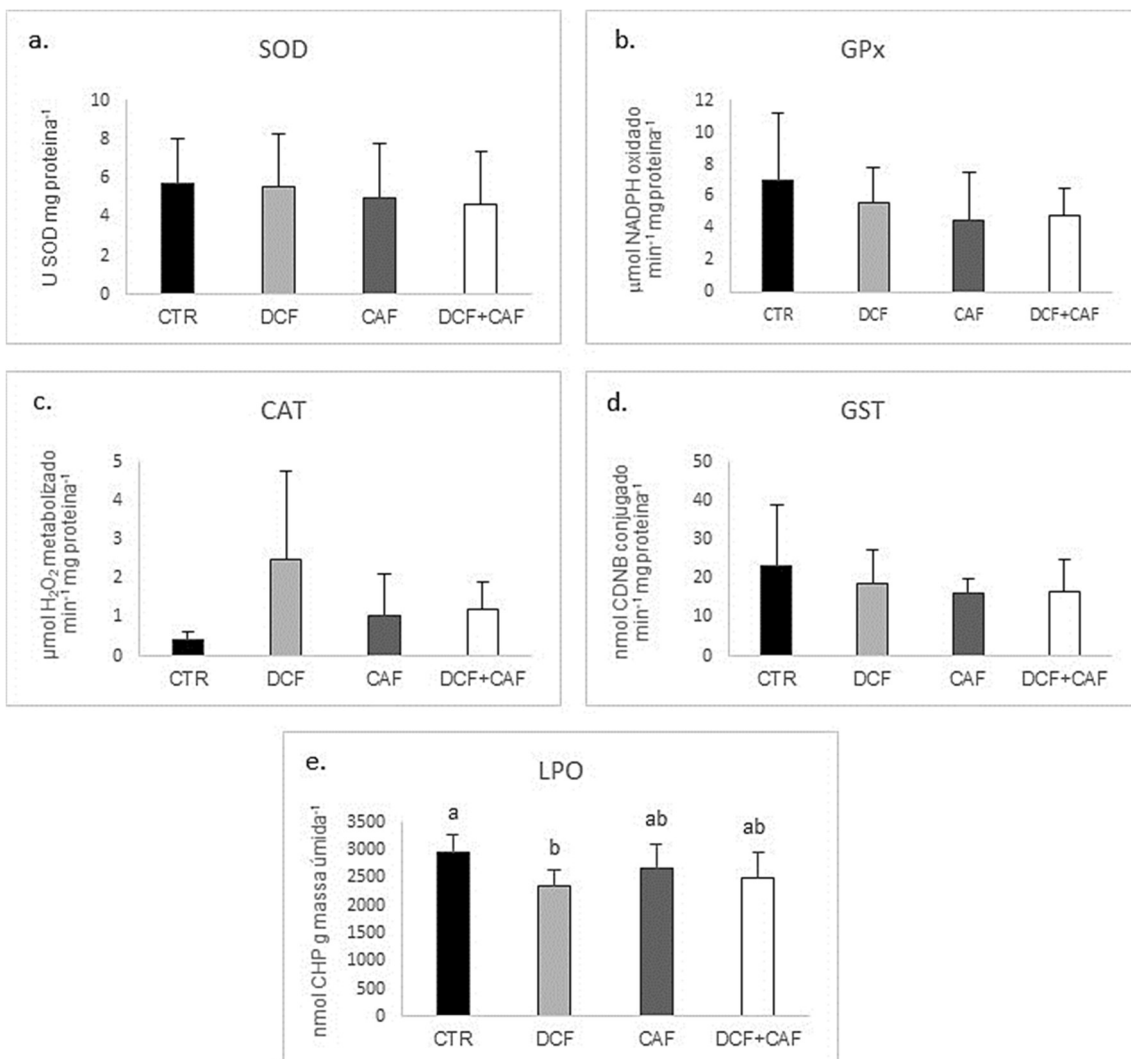
No fígado, a exposição aos fármacos evidenciou uma redução da atividade das enzimas antioxidantes. A atividade da SOD foi reduzida nos peixes expostos ao DCF isoladamente e combinado à CAF (Figura 1a,  $P = 0,007$ ), a atividade da GPx foi reduzida nos animais expostos ao DCF isolado (Figura 1b,  $P = 0,033$ ), a atividade da CAT foi reduzida nos peixes expostos à CAF (Figura 1c,  $P = 0,025$ ), enquanto a atividade da GST foi reduzida nos animais expostos à mistura dos fármacos (Figura 1d,  $P = 0,043$ ). Apesar da redução na atividade destas enzimas, só foi observado dano nas membranas hepáticas nos peixes expostos à CAF, quando comparado aos animais do grupo CTR (Figura 1e;  $P = 0,01$ ).

Com relação à atividade das enzimas nas brânquias, não foi observado nenhum efeito dos fármacos na atividade da SOD ( $P = 0,76$ ), GPx ( $P = 0,57$ ), CAT ( $P = 0,08$ ) e GST ( $P = 0,80$ ) (Figuras 2 a-d), no entanto, os resultados da LPO

mostraram um menor dano nas membranas dos peixes expostos ao DCF, em comparação aos animais do grupo CTR (Figura 2e; P = 0,016).



**Figura 1:** Biomarcadores de estresse oxidativo no fígado de machos de *A. altiparanae* nos diferentes tratamentos: CTR (controle), DCF (diclofenaco), CAF (cafeína), DCF+CAF (diclofenaco + cafeína) após 96 horas de exposição. Superóxido Dismutase (SOD) (a), Glutaciona Peroxidase (GPx) (b), Catalase (CAT) (c), Glutaciona S-Transferase (GST) (d) e Lipoperoxidação (LPO) (e). <sup>ab</sup> Letras diferentes representam diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos (ANOVA, P < 0,05). Valores expressos como Média ± Desvio Padrão. n = 12.



**Figura 2:** Biomarcadores de estresse oxidativo em brânquias de machos de *A. altiparanae* nos diferentes tratamentos: CTR (controle), DCF (diclofenaco), CAF (cafeína), DCF+CAF (diclofenaco + cafeína) após 96 horas de exposição. Superóxido Dismutase (SOD) (a), Glutaciona Peroxidase (GPx) (b), Catalase (CAT) (c), Glutaciona S-Transferase (GST) (d) e Lipoperoxidação (LPO) (e). <sup>ab</sup> Letras diferentes representam diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos (ANOVA,  $P < 0,05$ ). Valores expressos como Média  $\pm$  Desvio Padrão.  $n = 12$ .

### 3.2. Atividades enzimáticas da AChE e COX

No presente estudo não foram observadas diferenças estatísticas significativas na atividade da enzima AChE no cérebro ( $P = 0,99$ ) e no músculo ( $P = 0,70$ ) de machos adultos de *A. altiparanae* nos diferentes tratamentos experimentais (Tabela 1). Da mesma forma os animais expostos durante 96 h aos

fármacos não evidenciaram nenhum efeito sobre a atividade da COX no fígado (Tabela 1; P = 0,13).

**Tabela 1:** Atividade da acetilcolinesterase (AChE) no cérebro e no músculo, e da ciclooxigenase (COX) no fígado de machos de *A. altiparanae* nos diferentes tratamentos após 96 horas de exposição.

|         | AChE Cérebro<br>(nmol min <sup>-1</sup> mg<br>proteína <sup>-1</sup> ) | AChE Músculo<br>(nmol min <sup>-1</sup> mg<br>proteína <sup>-1</sup> ) | COX Fígado<br>(nmol min <sup>-1</sup> mL <sup>-1</sup> ) |
|---------|------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|
| CTR     | 53,25 ± 14,31                                                          | 19,57 ± 5,63                                                           | 28,20 ± 7,10                                             |
| DCF     | 52,77 ± 11,78                                                          | 18,03 ± 5,79                                                           | 30,30 ± 8,60                                             |
| CAF     | 56,94 ± 16,11                                                          | 17,10 ± 5,23                                                           | 40,30 ± 3,70                                             |
| DCF+CAF | 52,36 ± 11,20                                                          | 18,46 ± 3,14                                                           | 31,80 ± 8,20                                             |

CTR (controle), DCF (diclofenaco), CAF (cafeína), DCF+CAF (diclofenaco + cafeína). Valores expressos como Média ± Desvio Padrão. n = 12.

### 3.3. Biomarcadores de genotoxicidade

De acordo com os resultados das análises de genotoxicidade, não foi possível evidenciar danos genotóxicos nos animais, associados à exposição aguda aos fármacos, utilizando-se o teste cometa (P = 0,61) e os testes de micronúcleo e anormalidades nucleares (P = 0,62) (Tabela 2).

**Tabela 2:** Biomarcadores de genotoxicidade em machos de *A. altiparanae* nos diferentes tratamentos após 96 horas de exposição (Média ± Desvio Padrão).

|         | Teste Cometa<br>(Score) | Frequência ANs (%) | Frequência MN<br>(%) |
|---------|-------------------------|--------------------|----------------------|
| CTR     | 78,82 ± 12,29           | 0,06 ± 0,06        | 0                    |
| DCF     | 85,00 ± 9,05            | 0,05 ± 0,06        | 0                    |
| CAF     | 83,84 ± 4,48            | 0,06 ± 0,07        | 0                    |
| DCF+CAF | 83,53 ± 5,99            | 0,11 ± 0,10        | 0                    |

CTR (controle), DCF (diclofenaco), CAF (cafeína), DCF+CAF (diclofenaco + cafeína). ANs (Anormalidades Nucleares), MN (Micronúcleos). Valores expressos como Média ± Desvio Padrão. n = 12.

#### 4. Discussão

No presente estudo foi possível evidenciar que o DCF e a CAF, combinados ou isolados diminuíram a atividade de enzimas do sistema antioxidante hepático de machos adultos de *A. altiparanae* expostos a estes fármacos durante 96 h, podendo comprometer a saúde dos organismos. No entanto apenas a CAF causou lipoperoxidação hepática. A atividade das enzimas antioxidantes branquiais por sua parte, não apresentaram nenhuma alteração significativa, porém os organismos expostos ao DCF por separado evidenciaram uma menor LPO do que os peixes do CTR. Além disto, nas condições experimentais deste estudo os animais não apresentaram neurotoxicidade, nem alteração na atividade da COX, assim como também não foi possível observar genotoxicidade pela exposição aos fármacos.

O fígado é o órgão de maior geração de radicais livres, pois é neste órgão que se desenvolve um grande número de reações oxidativas (Atli et al. 2016), e foi neste órgão que foram observados os maiores efeitos dos fármacos sobre a atividade das enzimas do sistema de estresse oxidativo. Em geral, a atividade das enzimas antioxidantes foi reduzida nos animais expostos ao DCF (com exceção da CAT), contrário ao esperado, pois quando os organismos se encontram expostos a agentes tóxicos, a produção das EROs pode aumentar como consequência do processo de biotransformação destes compostos e, portanto, é de se esperar que o organismo aumente a atividade de seu sistema de defesa (Lesser, 2012; Atli et al., 2016), como tem sido reportado por outros autores em diferentes espécies de peixes. Islas-Flores et al. (2013) por exemplo, reportaram aumento da atividade das enzimas SOD, CAT e GPx no fígado e nas brânquias de *C. carpio* como consequência da exposição aguda ao DCF (7,098 mg L<sup>-1</sup>). O anterior era o esperado pelos autores pois estes justificaram que o metabolismo do DCF favorece a formação do ânion O<sup>2-</sup>, o qual ativa a SOD, transformando este ânion em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, e como consequência, um aumento da atividade da CAT e da GPx, que participam na dismutação deste composto em H<sub>2</sub>O. Da mesma forma, em *H. malabaricus* alimentado com *Astyanax* sp. previamente injetados com 2 e 20 µg Kg<sup>-1</sup> de DCF, foi observado um aumento nas atividades da SOD e da GPx (Guiloski et al., 2015)

comprovando uma ativação do sistema antioxidante como consequência da geração de EROs.

Porém, a inibição observada no nosso trabalho pode ser explicada pelo fato de vários metabolitos do DCF apresentarem a capacidade de se ligar às proteínas e inibir a atividade destas enzimas (Islas-Flores et al., 2013), o que provavelmente aconteceu em *A. altiparanae* exposto ao DCF. Em murinos, já foi reportado que a exposição ao 10 ou 100 mg Kg<sup>-1</sup> de DCF resulta num maior nível de proteínas oxidadas, principalmente no coração e fígado destes animais, gerando desta forma um desequilíbrio na proteostasis (Ghosh et al., 2016) o que poderia comprometer a saúde dos organismos baixo exposições crônicas. Contudo, a exposição aguda ao DCF, isolado ou combinado, não desencadeou dano nas membranas lipídicas, ao contrário do observado na exposição à CAF.

Com relação à CAF, os animais expostos a este composto apresentaram uma diminuição na atividade da enzima CAT, o que pode ter refletido no aumento da lipoperoxidação considerando que a CAT age principalmente frente a danos mais severos em comparação com a GPx (Matés, 2000; Stepanova et al., 2013; Atli et al., 2016). Em ratos, já tem sido reportado que a administração de 6 mg Kg<sup>-1</sup> de CAF suprime a atividade da CAT hepática (Barcelos et al., 2014); porém, existem poucos trabalhos sobre o efeito deste fármaco no sistema antioxidante de peixes.

Embora o número de estudos de exposição de organismos aquáticos à CAF seja reduzido, Santos-Silva et al. (2018) avaliaram o efeito da exposição de *Prochilodus lineatus* a diferentes concentrações de CAF (0,3, 3 e 30 µg L<sup>-1</sup>) durante 24 e 168 h e não foram observadas alterações na atividade da GST no cérebro e no fígado, assim como também não houve alteração na LPO, diferente do que foi observado no presente estudo. Os resultados das enzimas antioxidantes hepáticas e LPO mostraram um efeito mais tóxico dos compostos separadamente do que misturados; sendo evidente um dano mais pronunciado à exposição à CAF, já que os peixes deste tratamento apresentaram LPO hepática.

Segundo os resultados disponíveis na literatura fica evidente que o efeito de compostos xenobióticos sobre os organismos aquáticos não pode ser generalizado, pois nem todas as espécies desencadeiam as mesmas respostas frente à exposição



a este fármaco, o que sugere uma diferença na tolerância entre as diferentes espécies. Além disso, também é possível observar que o efeito vai depender do tecido, das concentrações e do tempo de exposição. Em *Oreochromis niloticus*, à medida que a concentração (0,17, 0,34 e 0,68 mg L<sup>-1</sup>) e o tempo de exposição (15, 30, 45 e 60 dias) ao DCF foi aumentando, aumentou também a atividade da SOD, GPx e GST, possivelmente como consequência da bioacumulação do composto (Pandey et al., 2017). Já em *Rhamdia quelen* expostos às diferentes concentrações de DCF por 96 h (0,2, 2 e 20 µg L<sup>-1</sup>) não foram observadas alterações nas enzimas antioxidantes no fígado, mas sim um aumento da atividade da SOD no rim posterior utilizando-se as duas concentrações mais elevadas (Ghelfi et al., 2016). No presente trabalho também foi possível observar uma diferença nas respostas do sistema antioxidante a exposição dos fármacos entre os dois órgãos avaliados, evidenciando-se um efeito negativo sobre o sistema antioxidante hepático, enquanto no branquial não foi possível evidenciar nenhum efeito, mesmo sendo as brânquias o primeiro órgão a entrar em contato com os compostos xenobióticos.

Contudo, os peixes expostos ao DCF (isolado) demonstraram um menor valor de LPO branquial comparadas com os peixes do CTR, o que pode ser explicado provavelmente pelo aumento da atividade da CAT branquial que, como mencionado anteriormente, age frente a danos severos (Matés, 2000; Stepanova et al., 2013; Atli et al., 2016). É importante mencionar que mesmo observando uma tendência à aumento da atividade da CAT, esta não foi estatisticamente significativa, podendo ser consequência da variação interindividual, considerando que os animais apresentam respostas fisiológicas diferentes, que é refletido no elevado desvio padrão.

Outro biomarcador usado no presente estudo, neste caso para avaliar a neurotoxicidade do DCF e da CAF, foi a atividade da enzima AChE, cuja função principal é catalisar a hidrólise de acetilcolina permitindo assim a transmissão de impulsos nervosos. Na espécie estudada no presente trabalho, o DCF e a CAF não apresentaram nenhum efeito sobre a atividade da AChE, possivelmente pela curta duração da exposição, mas também é possível que os compostos farmacológicos avaliados não apresentem um efeito neurotóxico em peixes. Geralmente, a

atividade desta enzima é suscetível às alterações decorrentes da exposição a compostos xenobióticos, principalmente a pesticidas (Colin et al., 2016), porém, deve-se considerar que os efeitos que cada composto apresenta em um determinado organismo dependerão de muitas variáveis, incluindo a sensibilidade da espécie e o tempo e a concentração de exposição. Por exemplo, Oliveira dos Santos et al. (2020) observaram um aumento na atividade da AChE no músculo de *Phalloceros harpagos* sob exposição aguda ao propranolol, um composto farmacológico projetado para o tratamento de patologias cardíacas e cujo mecanismo de ação é bloquear o efeito dos agonistas dos  $\beta$  bloqueadores. Este efeito foi considerado atípico considerando-se que o propranolol geralmente inibe a atividade da AChE em várias espécies.

Apesar da função principal do DCF ser a inibição da enzima COX, e já terem sido reportadas altas taxas de inibição da COX como consequência à exposição ao DCF, mesmo em baixas concentrações ( $\text{ng L}^{-1}$ ), e entre outros NSAIDs (Hoeger et al., 2005; Bing-Shu et al., 2017), neste experimento não foi observado nenhum efeito por parte dos tratamentos avaliados no fígado de *A. altiparanae*. Da mesma forma, embora se espere que a exposição ao DCF leve a uma regulação negativa dos genes *cox1* e *cox2*, Näslud et al. (2017) não observaram nenhum efeito sobre a expressão desses genes no esgana-gato (*Gasterosteus aculeatus*) exposto a diferentes concentrações de DCF (5, 20, 80 e  $320 \mu\text{g L}^{-1}$ ) durante 28 dias; enquanto na truta-arco-íris (*O. mykiss*), apenas a menor concentração de três avaliadas (1, 10 e  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ ) desregulou os dois genes (Cuklev et al., 2011).

Em seres humanos a ação proposta para o DCF é inibir a atividade da COX em um período curto de tempo, considerando que o tempo de máxima absorção do DCF pode ser a partir de 10 minutos dependendo do modo de administração (Davies and Anderson, 1997). Sendo assim, é provável que a falta de resposta no presente trabalho seja consequência da alta concentração usada no bioensaio ( $\text{mg L}^{-1}$ ), tendo em conta que este tipo de composto age em concentrações mais baixas. Respostas fisiológicas dependentes da concentração já foram observadas em *Salmo trutta* com efeito inflamatório do DCF no rim nas concentrações mais baixas

testadas (0,5 e 5  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), enquanto na maior concentração avaliada (50  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) não foi possível detectar resposta inflamatória (Hoeger et al., 2005).

Finalmente, os resultados evidenciaram para ambas as análises de genotoxicidade, que os fármacos avaliados não desencadearam danos genéticos nem citotóxicos. Geralmente o teste cometa é mais sensível às alterações no ambiente, sendo um biomarcador indicado em exposições agudas, enquanto o teste de micronúcleos e a detecção de anormalidades nucleares são mais indicados quando os organismos são submetidos cronicamente a agentes genotóxicos (Rocco et al., 2011; Braham et al., 2017). Vários estudos sugerem que a genotoxicidade do DCF depende muito da sensibilidade da espécie, a concentração utilizada e o tempo de exposição (Rocco et al., 2011; Guiloski et al., 2017). Porém, os resultados do presente experimento para o teste cometa são similares aos encontrados por outros autores que avaliaram os efeitos do DCF e CAF em 96 h. Ghelfi et al. (2016) não observaram danos genotóxicos no sangue e no fígado de *R. quelen* expostos a 0,2, 2 e 20  $\mu\text{g L}^{-1}$  de DCF por 96 h. Da mesma forma, Santos-Silva et al. (2018) não observaram efeitos da CAF (0,3, 3 e 30  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) sobre a fragmentação de DNA em *P. lineatus* expostos durante 24 e 168 h, o que corrobora os resultados do presente trabalho.

Por outro lado, estudos de exposição aguda que utilizem análises de MN e ENAs como biomarcadores são escassos, pois os micronúcleos são gerados durante a mitose, quando fragmentos de cromossomos ou cromossomos inteiros não são incluídos nos núcleos das células novas durante o final da telófase (Fenech et al., 2011). Considerando que o processo de eritropoiese pode demorar em média 12 dias dependendo da espécie (Yen-Hua et al., 2017), este biomarcador talvez não seja o mais adequado para avaliar o efeito a exposições agudas de compostos xenobióticos. Este fato pode ser comprovado no trabalho de Rocco et al. (2012), no qual indivíduos de zebrafish (*D. rerio*) expostos aos antibióticos eritromicina e lincomicina por diferentes períodos (7, 14, 28 e 42 dias), apresentaram um maior número de MNs à medida que os dias de exposição aumentavam.

Uma análise dos resultados do presente estudo e experimentos prévios da literatura deixam evidente que as respostas fisiológicas podem variar quando os

animais são expostos a estes fármacos em concentrações na faixa de  $\text{ng L}^{-1}$ ,  $\mu\text{g L}^{-1}$  ou  $\text{mg L}^{-1}$ . O tempo de exposição também é um fator relevante nestes estudos, pois 96 h pode ser um período muito curto para gerar respostas, ou pelo contrário, no momento da coleta os organismos podem já ter desencadeado respostas fisiológicas que permitiram a manutenção do equilíbrio homeostático.

## 5. Conclusão

Os resultados do presente estudo sugerem que a mistura de compostos não apresentou fortes efeitos sinérgicos ou antagônicos. Os efeitos mais pronunciados foram observados com a exposição às drogas separadamente. No caso de efeitos isolados, ambos os compostos alteraram as enzimas, mas apenas a CAF causou LPO. Com base nesses dados, os efeitos da CAF foram mais prejudiciais em machos adultos de *A. altiparanae*. Adicionalmente, estes compostos não alteram o sistema antioxidante em brânquias.

## Agradecimentos

Este estudo teve o suporte financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (processos: 2017/11530-1 e 2014/16320-7), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Processo nº 152753/2017-6) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (Código de financiamento 001). Os autores agradecem a doação dos animais pela Estação de Hidrobiologia e Aquicultura de Paraibuna, pertencente à Companhia Energética de São Paulo – CESP, no município de Paraibuna – SP; à equipe do LAMEROA (IB-USP) pelo auxílio nas coletas; ao Laboratório de Evolução e Desenvolvimento de Invertebrados (Prof. Dr. Federico Brown) da Universidade de São Paulo (IB-USP) pela utilização do microscópio de fluorescência; ao Laboratório de Ecofisiologia Animal (Profa. Dra. Claudia B. Martinez; UEL-Londrina/PR) pelo treinamento das técnicas de genotoxicidade e ao IB-USP pela logística e facilidades.

## Referências

- Abdalla, R.P., Kida, B.M.S., Pinheiro, J.P.S., Oliveira, L.F., Martinez, C.B.F., Moreira, R.G. 2019. Exposure to aluminum, aluminum þ manganese and acid pH triggers different antioxidant responses in gills and liver of *Astyanax altiparanae* (Teleostei: Characiformes: Characidae) males. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology* 215, 33-40.
- Acuña, V., Ginebreda, A., Mor, J.R., Petrovic, M., Sabater, S., Sumpter, J., Barceló, D. 2015. Balancing the health benefits and environmental risks of pharmaceuticals: Diclofenac as an example. *Environment International* 85, 327–333.
- Almeida, G.A., Weber, R.R. 2005. Fármacos na represa Billings. *Revista Saúde e Ambiente* 6, 7-13.
- Al-Sabti, K., Metcalfe, C.D. 1995. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutation Research* 343, 121–135.
- Alves-Costa, J.R.M., Mela, M., Silva de Assis, H.C., Pelletier, E., Randi, M.A.F., Oliveira Ribeiro, C.A., 2007. Enzymatic inhibition and morphological changes in *Hoplias malabaricus* from dietary exposure to lead (II) or methylmercury. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 67, 82–88.
- Atli, G., Canli, E.G., Eroglu, A., Canli, M. 2016. Characterization of antioxidant system parameters in four freshwater fish species. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 126, 30-37.
- Barcelos, R.P., Souza, M.A., Amaral, G.P., Stefanello, S.T., Bresciani, G., Figuera, M.R., Soares, F.A.A., Barbosa, N.V. 2014. Caffeine supplementation modulates oxidative stress markers in the liver of trained rats. *Life Sciences* 96 (1-2), 40-45.
- Beutler, E. 1975. Catalase. In E. Beutler (Ed.), *Red Cell Metabolism. A manual of biochemical methods*. New York: Grune and Stratton. P. 89-90.
- Bing-Shu, H., Jun, W., Juan, L., Xia-Min, H. 2017. Eco-pharmacovigilance of non-steroidal anti-inflammatory drugs: Necessity and opportunities. *Chemosphere* 181, 178-189.

- Braham, R.P., Blazer, V.S., Shaw, C.H., Mazik, P.M. 2017. Micronuclei and other erythrocyte nuclear abnormalities in fishes from the great lakes basin, USA. *Environmental and molecular mutagenesis* 58, 570-581.
- Capolupo, M., Valbonesi, P., Kiwan, A., Buratti, S., Franzellitti, S., Fabbri, E. 2016. Use of an integrated biomarker-based strategy to evaluate physiological stress responses induced by environmental concentrations of caffeine in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Science of the Total Environment* 563-564, 538-548.
- Cappelletti, S., Daria, P., Sani, G., Aromatario, M. 2015. Caffeine: Cognitive and physical performance enhancer or psychoactive drug? *Current Neuropharmacology* 13, 71-88.
- Carrasco, K.R., Tilbury, K.L., Myers, M.S. 1990. Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science* 47, 2123–2136.
- Cherik, D., Benali, M., Louhab, K. 2015. Occurrence, ecotoxicology, removal of diclofenac by adsorption on activated carbon and biodegradation and its effect on bacterial community: A review. *World Scientific News* 10, 116-144.
- Colin, N., Porte, C., Fernandes, D., Barata, C., Padrós, F., Carrassón, M., Monroy, M., Cano-Rocabayera, O., de Sosto, A., Piña, B., Maceda-Veiga, A. 2016. Ecological relevance of biomarkers in monitoring studies of macro-invertebrates and fish in Mediterranean rivers. *Science of the Total Environment* 540, 307–323.
- Cuklev, F., Kristiansson, E., Fick, J., Asker, N., Förlin, L., Larsson, D.G.J. 2011. Diclofenac in fish: blood plasma levels similar to human therapeutic levels affect global hepatic gene expression. *Environmental Toxicology and Chemistry* 30 (9), 2126–2134.
- Davies, N.M., Anderson, K.E. 1997. Clinical pharmacokinetics of diclofenac therapeutic insights and pitfalls. *Clinical Pharmacokinetics* 33 (3), 184-213.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, J.R.V., Featherstone, R.M. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemistry and Pharmacology* 7, 88-95.

- European Commission, 2012. Revised directive of the European Parliament and of the Council on priority substances in the field of water quality. Disponível em: <http://ec.europa.eu/environment/water/water-danger>.
- Evrard, E., Devaux, A., Bony, S., Burgeot, T., Riso, R., Budzinski, H., Le Du, M., Quiniou, L., Laroche, J. 2010. Responses of the European flounder *Platichthys flesus* to the chemical stress in estuaries: Load of contaminants, gene expression, cellular impact and growth rate. *Biomarkers* 15 (2), 111-127.
- Fenech, M., Kirsch-Volders, M., Natarajan, A.T., Surrallés, J., Crott, J.W., Parry, J.J., Norppa, Y.H., Eastmond, D.A., Tucker, J.D., Thomas, P. 2011. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells: Review. *Mutagenesis* 26 (1), 125–132.
- Garutti, V., Britski, H.A. 2000. 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 e Tecnologia, Série Zoologia Porto Alegre* 13, 65–88.
- Ghelfi, A., Ribas, J.L., Guiloski, I.C., Bettim, F.L., Piacini, L.D., Cestari, M.M., Pereira, A.J., Sasaki, G.L., Silva de Assis, H.C. 2016. Evaluation of biochemical, genetic and hematological biomarkers in a commercial catfish *Rhamdia quelen* exposed to diclofenac. *Bulletin Environmental Contamination and Toxicology* 96 (1), 49-54.
- Godoi, F.G.A., Muñoz-Peñuela, M., Gomes, A.D.O., Tolussi, C.E., Brambila-Souza, G., Branco, G.S., Lo Nostro, F.L., Moreira, R.G. 2020. Endocrine disruptive action of diclofenac and caffeine on *Astyanax altiparanae* males (Teleostei: Characiformes: Characidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology* 231, 108720.
- Ghosh, R., Goswami, S.K., Feitoza, L.F.B.B., Hammock, B., Gomese, A.B. 2016. Diclofenac induces proteasome and mitochondrial dysfunction in murine cardiomyocytes and hearts. *International Journal of Cardiology* 223, 923–935.
- Gomes, A.D., Tolussi, C.E., Ribeiro, C.S., Honji, R.M., Moreira, R.G. 2015. The role of ovarian steroids in reproductive plasticity in *Hoplias malabaricus* (Teleostei:

- Characiformes: Erythrinidae) in tropical reservoirs with different degrees of pollution. *General and Comparative Endocrinology* 222, 1–10.
- Gomes, A.D., Tolussi, C.E., Boëchat, I.G., Pompêo, M.L.M., Cortez, M.P.T., Honji, R.M., Moreira, R.G. 2016. Fatty acid composition of tropical fish depends on reservoir trophic status and fish feeding habit. *Lipids* 51 (10), 1193-1206.
- Guiloski, I.C., Coelho-Ribas, J.L., da Silva-Pereira, L., Perbiche-Neves, A.P., Silva-de Assis, H.C. 2015. Effects of trophic exposure to dexamethasone and diclofenac in freshwater fish. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 114, 204-211.
- Guiloski I.C., Piancini, L.D.S., Dagostim, A.C., Calado, S.L.M., Fávares, L.F., Boschen, S.L., Cestari, M.M., Cunha, C., Assis, H.C.S. 2017. Effects of environmentally relevant concentrations of the anti-inflammatory drug diclofenac in freshwater fish *Rhamdia quelen*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 139, 291-300.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B. 1974. Glutathione S-Transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry* 249 (22), 7130-7139.
- Hermes-Lima, M., Willmore, W.G., Storey, K.B. 1995. Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe (III) xylene orange complex formation. *Free Radical Biology and Medicine* 19 (3), 271-280.
- Hoeger, B., Köllner, B., Dietrich, D.R., Hitzfeld, B. 2005. Water-borne diclofenac affects kidney and gill integrity and selected immune parameters in brown trout (*Salmo trutta* F. fario). *Aquatic Toxicology* 75, 53-64.
- Hopkins, J., Tudhope, G. R. 1973. Glutathione peroxidase in human red cells in health and disease. *Journal of Haematology* 25, 563-575.
- Islas-Flores, H., Gómez-Oliván, L. M., Galar-Martínez, M., Colín-Cruz, A., Neri-Cruz, N., García-Medina, S. 2013. Diclofenac-induced oxidative stress in brain, liver, gill and blood of common carp (*Cyprinus carpio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 92, 32-38.



- Kida, B.M.S., Abdalla, R.P., Moreira, R.G. 2016. Effects of acidic water, aluminum, and manganese on testicular steroidogenesis in *Astyanax altiparanae*. *Fish Physiology and Biochemistry* 43, 1347-1356.
- Kobayashi, H., Sugiyama, C., Morikawa, Y., Hayashi, M., Sofuni, T. 1995. Comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis. *MMS Communications* 3, 103–115.
- Lee, W., Wang, Y.C. 2015. Assessing developmental toxicity of caffeine and sweeteners in medaka (*Oryzias latipes*). *Springer Plus* 4, 486.
- Lesser, M.P. 2012. Oxidative stress in tropical marine ecosystems. In: D, Abele, J. P, Vasquez-Medina, T, Zenteno-Savín (Eds.). *Oxidative Stress in Aquatic Ecosystems*. Wiley: Blackwell, pp. 9–19 cap 1.
- López-Doval, J.C., Montagner, C.C., de Albuquerque, A.F., Moschini-Carlos, V., Umbuzeiro, G., Pompêo, M. 2017. Nutrients, emerging pollutants and pesticides in a tropical urban reservoir: Spatial distributions and risk assessment. *Science of the Total Environment* 575, 1307–1324.
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biology Chemistry* 193, 265-275.
- Marques, V.H., Moreira, R.G., Gomes, A.D. 2020. Influence of tropical reservoirs eutrophication on the polyunsaturated fatty acid profile in *Astyanax altiparanae* (Pisces: Characidae). *Science of the Total Environment* 717, 137-182.
- Matés, J.M. 2000. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology* 153, 83-104.
- Maulvault, A.L., Barbosa, V., Alves, R., Anacleto, P., Camacho, C., Cunha, S., Fernandes, J.O., Ferreira, P.P., Rosa, R., Marques, A., Diniz, M. 2018. Integrated multi-biomarker responses of juvenile seabass to diclofenac, warming and acidification co-exposure. *Aquatic Toxicology* 202, 65-79.
- McCord, J.E. Fridovich, I. 1969. Superoxide dismutase an enzymatic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *Journal of Biological Chemistry* 244, 6049-6055.

- Moore, M.T., Greenway, S.L., Farris, J.L., Guerra, B. 2008. Assessing Caffeine as an Emerging Environmental Concern Using Conventional Approaches. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 54, 31–35.
- National Research Council. 2011. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, 8th ed. National Academies, Washington, DC. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK54050>
- Näslund, J., Fick, J., Asker, N., Ekman, E., Larsson, D.G.J., Norrgren, L. 2017. Diclofenac affects kidney histology in the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) at low µg/L concentrations. *Aquatic Toxicology* 189, 87-96.
- Nehlig, A., Daval, J.L., Debry, G. 1992. Caffeine and the central nervous system: mechanisms of action, biochemical, metabolic and psychostimulant effects. *Brain Research Reviews* 17, 139-170.
- Oliveira, T.D., Martini, W.S., Santos, M.D.R., Matos, M.A.C., da Rocha, L.L. 2015. Caffeine Oxidation in Water by Fenton and Fenton-Like Processes: Effects of inorganic anions and ecotoxicological evaluation on aquatic organisms. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 26 (1), 178-184.
- Oliveira dos Santos, P.R., Costa, M.J. dos Santos, A.C.A., Silva-Zacarína, E.C.M. Nunes, B. 2020. Neurotoxic and respiratory effects of human use drugs on a Neotropical fish species, *Phalloceros harpagos*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology* 230, 108683.
- Pandey, P.K., Ajima, M.N.O., Kumar, K., Poojary, N., Kumar, S. 2017. Evaluation of DNA damage and physiological responses in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) exposed to sub-lethal diclofenac (DCF). *Aquatic Toxicology* 186, 205-214.
- Pinheiro, J.P.S., Assis, C.B., Sanches, E.A., Moreira, R.G. 2020. Aluminum, at an environmental concentration, associated with acidic pH and high water temperature, causes impairment of sperm quality in the freshwater teleost *Astyanax altiparanae* (Teleostei: Characidae). *Environmental Pollution* 262, 114252.
- Pinheiro, J.P.S., Assis, C.B., Muñoz-Peñuela, M., Barbosa Júnior, F., Correia, T.G., Moreira, R.G. 2019. Water temperature and acid pH influence the cytotoxic and

- genotoxic effects of aluminum in the freshwater teleost *Astyanax altiparanae* (Teleostei: Characidae). *Chemosphere* 220, 266-274.
- Quadra, G.R., Souza, H.O., Costa, R.S., Fernandez, M.A.S. 2017. Do pharmaceuticals reach and affect the aquatic ecosystems in Brazil? A critical review of current studies in a developing country. *Environmental Science and Pollution Research* 24, 1200–1218.
- Rocco, L., Frenzilli, G., Fusco, D., Peluso, C., Stingo, V. 2011. Evaluation of zebrafish DNA integrity after exposure to pharmacological agents present in aquatic environments. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73, 1530-1536.
- Rocco, L., Peluso, C., Stingo, V. 2012. Micronucleus test and comet assay for the evaluation of zebrafish genomic damage induced by erythromycin and lincomycin. *Environmental Toxicology* 27(10), 598-604.
- Santos-Silva, T.G., Montagner, C.C., Martinez, C.B.R. 2018. Evaluation of caffeine effects on biochemical and genotoxic biomarkers in the neotropical freshwater teleost *Prochilodus lineatus*. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 58, 237-242.
- Schwaiger, J., Ferling, H., Mallowa, U., Wintermayr, H., Negele, R.D. 2004. Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac Part I: histopathological alterations and bioaccumulation in rainbow trout. *Aquatic Toxicology* 68, 141–150.
- Shi, C., He, Y., Liu, J., Lu, Y., Fan, Y., Liang, Y., Xu, Y. 2019. Ecotoxicological effect of single and combined exposure of carbamazepine and cadmium on female *Danio rerio*: A Multibiomarker Study. *Applied Science* 9, 1362.
- Shihomatsu, H.M., Martins, E.A.J., Cotrim, M.E.B., Lebre, D.T., Ortiz, N., Pires, M.A.F. 2017. Guarapiranga Reservoir-Pharmaceuticals and historical urban occupation in a water source. *Journal of Geoscience and Environmental Protection* 5, 1-17.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L.A. 1988. Single technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research* 175, 184–191.

- Starling, M.C.V.M., Amorim, C.C., Leão, M.M.D 2019. Occurrence, control and fate of contaminants of emerging concern in environmental compartments in Brazil. *Journal of Hazardous Materials* 372, 17-36.
- Stepanova, S., Praskova, E., Chromcova, L., Plhalova, L., Prokes, M., Blahova, J., Svobodova, Z. 2013. The effects of diclofenac on early life stages of common carp (*Cyprinus carpio*). *Environmental Toxicology and Pharmacology* 35, 454-460.
- Tejada, C., Quiñonez, E., Peña, M. 2014. Contaminantes emergentes en aguas: metabolitos de fármacos. Una revisión. *Revista Facultad de Ciencias Basicas* 10(1), 80-101.
- Tolussi, C.E., Gomes, A.D., Kumar, A., Ribeiro, C.S., Lo Nostro, F.L., Bain, P.A., Souza, G.B., Da Cuña, R., Honji, R.M., Moreira, R.G. 2018. Environmental pollution affects molecular and biochemical responses during gonadal maturation of *Astyanax fasciatus* (Teleostei: Characiformes: Characidae). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 147, 926-934.
- Triebkorn, R., Casper, H., Heyd, A., Eikemper, R., Köhler, H.R., Schwaiger, J. 2004. Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac. Part II. Cytological effects in liver, kidney, gills and intestine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology* 68, 151-166.
- Van der Brandohf, E.J., Montforts, M. 2010. Fish embryotoxicity of carbamazepine, diclofenac and metoprolol. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73, 862-1866.
- Wang, J., Gardinali, P.R. 2012. Analysis of selected pharmaceuticals in fish and the freshwater bodies directly affected by reclaimed water using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 404, 2711–2720.
- Yen-Hua, Jhe-Ruei, S., Chia-Ling, H., Sen-Shyong, J. 2017. Zinc as a signal to stimulate red blood cell formation in fish. *International Journal of Molecular Science* 18 (1), 138.

## CAPÍTULO 2

### **Efeitos neurotóxicos, antioxidantes e genotóxicos em machos de *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae) expostos a concentrações ambientalmente relevantes de fármacos**

Marcela Muñoz-Peñuela<sup>a\*</sup>, Fabiana Laura Lo Nostro<sup>b</sup>, Aline Dal'Olio Gomes<sup>a</sup>, Carlos Eduardo Tolussi<sup>c</sup>, Giovana Souza Branco<sup>a</sup>, João Paulo Silva Pinheiro<sup>a</sup>, Renata Guimarães Moreira<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Fisiologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. Rua do Matão, Trav.14, n° 321, 05508-090 São Paulo, SP, Brazil

<sup>b</sup> Laboratorio de Ecotoxicología Acuática, Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires & IBBEA, CONICET-UBA. Ciudad Universitaria (C1428EHA), Buenos Aires, Argentina

<sup>c</sup> Universidade Anhembi-Morumbi, Campus Mooca, São Paulo SP, Brazil

\*marce8407@gmail.com

#### **Abstract**

Several drugs can be found in the aquatic environment, such as the anti-inflammatory diclofenac (DCF) and the stimulant caffeine (CAF). These compounds can trigger negative effects on the behavior, reproduction and metabolism of aquatic fauna. However, these responses may vary according to the species, organ studied and the time of exposure. The present study aimed to evaluate the neurotoxic, antioxidant and genotoxic responses in males of *Astyanax altiparanae* against subchronic exposure to relevant environmental concentrations of DCF (0.4 µg L<sup>-1</sup>) and CAF (27.5 µg L<sup>-1</sup>). Adult males of *A. altiparanae* were exposed for 14 days to DCF and CAF (separate and combined) for analysis of acetylcholinesterase (AChE) activity in the brain and muscle (neurotoxicity), cyclooxygenase (COX) activity in the liver, biomarkers of oxidative stress in the gills and liver (antioxidant enzymes: superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), catalase (CAT) and glutathione S-transferase (GST)) and lipoperoxidation (LPO)), as well as biomarkers

of genotoxicity in blood: comet test, micronucleus (MN) and nuclear abnormalities (NAs). The results showed a neurotoxic effect through AChE inhibition in fish muscle exposed to DCF and CAF separated and combined, as well as COX inhibition in animals exposed to DCF, separated and combined, in relation to the control group. Exposure to CAF had no effect on oxidative stress biomarkers, while DCF and the mixture acted on antioxidant enzymes with inducing and inhibitory effects on the gills and liver. LPO was observed only in fish exposed to the drug mixture, and genetic damage only in animals exposed to CAF separately. The results showed that CAF presents few toxic effects on *A. altiparanae*, however, when mixed with DCF, it contributes to potentiate toxic effects, such as inhibition of oxidative stress enzymes and hepatic LPO, while DCF alone or in combination produces a general inhibition of enzymes of vital importance.

**Keywords:** genotoxicity, oxidative stress; pharmaceutical compounds; neurotoxicity, subchronic toxicity

## Resumo

Diversos fármacos podem ser encontrados no ambiente aquático, como o anti-inflamatório diclofenaco (DCF) e o estimulante cafeína (CAF). Esses compostos podem desencadear efeitos negativos no comportamento, na reprodução e no metabolismo da fauna aquática. Entretanto, essas respostas podem variar de acordo com a espécie, órgão estudado e o tempo de exposição. O presente estudo teve por objetivo avaliar as respostas neurotóxicas, antioxidantes e genotóxicas em machos de *Astyanax altiparanae* frente à exposição subcrônica a concentrações ambientais relevantes de DCF ( $0,4 \mu\text{g L}^{-1}$ ) e CAF ( $27,5 \mu\text{g L}^{-1}$ ). Machos adultos de *A. altiparanae* foram expostos durante 14 dias ao DCF e/ou CAF (separados e combinados) para a análise da atividade da acetilcolinesterase (AChE) no cérebro e músculo (neurotoxicidade), da atividade da cicloxigenase (COX) no fígado, biomarcadores de estresse oxidativo nas brânquias e fígado (enzimas antioxidantes: superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GPx), catalase

(CAT) e glutathione S-transferase (GST)) e lipoperoxidação (LPO)), assim como biomarcadores de genotoxicidade no sangue por meio do teste de cometa, micronúcleo (MN) e anormalidades nucleares (ANs). Os resultados mostraram efeito neurotóxico por meio da inibição da AChE no músculo dos peixes expostos ao DCF e a CAF separados e combinados, assim como a inibição da COX nos animais expostos ao DCF em relação ao grupo controle. A exposição a CAF não apresentou nenhum efeito nos biomarcadores de estresse oxidativo, enquanto o DCF e a mistura atuaram nas enzimas antioxidantes com efeitos indutores e inibidores nas brânquias e fígado, e só a mistura dos fármacos aumentou a LPO hepática. Porém, os animais expostos apenas à CAF apresentaram danos genotóxicos. Os resultados evidenciaram que a CAF *per se* apresenta poucos efeitos tóxicos sobre *A. altiparanae*, porém, quando misturada com o DCF contribui para potencializar os efeitos tóxicos, como inibição de enzimas de estresse oxidativo e LPO hepática, enquanto o DCF sozinho ou combinado produz uma inibição geral de enzimas de vital importância.

**Palavras-chave:** estresse oxidativo; fármacos, genotoxicidade, neurotoxicidade, toxicidade subcrônica

### **Highlights**

- \* O diclofenaco e a cafeína, isolados ou combinados, desencadearam efeitos neurotóxicos em *A. altiparanae*.
- \* O diclofenaco isolado ou combinado inibiu a ciclooxigenase em *A. altiparanae*.
- \* O diclofenaco isolado ou combinado gerou estresse oxidativo em *A. altiparanae*.
- \* A cafeína causou genotoxicidade em *A. altiparanae*.

## **1. Introdução**

Os compostos farmacológicos são produtos químicos bioativos produzidos para melhorar a saúde de seres humanos e animais (Acuña et al., 2015), atuando

em vias metabólicas e moleculares específicas (Cooper et al., 2008). No entanto, esses compostos e seus metabolitos atingem os corpos d'águas superficiais por meio de descarte de estações de tratamento de águas residuais, que até o momento não possuem a tecnologia necessária para eliminar completamente os produtos farmacêuticos da água, pois esta prática implica em um alto custo (Gimeno et al., 2018), podendo descartar a água sem nenhum controle ou tratamento (WHO, 2011).

O tratamento de seres humanos e/ou animais com estes fármacos normalmente é realizado com baixas concentrações de fármacos, sendo assim, no ambiente aquático estes se encontram em concentrações na faixa de  $\text{ng L}^{-1}$  a  $\mu\text{g L}^{-1}$ , mas mesmo assim podem desencadear efeitos negativos sobre processos biológicos na fauna, tais como reprodução, crescimento, metabolismo, imunidade, alimentação, locomoção e comportamento (Stepanova et al., 2013; Mezzelani et al., 2018).

Embora a presença de diferentes fármacos em corpos d'água de superfície seja um fato conhecido, poucos medicamentos possuem padrões de qualidade ambiental (EQS) (Acuña et al., 2015), que são estabelecidos a partir de processos científicos (estudos ecotoxicológicos) e políticos (i.e. Conselho e Parlamento Europeu) por agências ambientais, países e territórios, com a finalidade de proteger a saúde humana e a vida aquática (Gimeno et al., 2018). Desta forma, ainda são necessários estudos, principalmente a longo prazo, para se avaliar o efeito na fauna aquática, de cada composto em concentrações presentes no meio ambiente, por meio de ensaios de efeito crônico. Estes estudos devem considerar a especificidade animal em relação a sensibilidade ao fármaco, bem como as características particulares de cada região do planeta. Adicionalmente, a maioria dos trabalhos considera os efeitos de um único produto químico, desprezando a realidade dos sistemas ambientais que, geralmente, possuem uma mistura complexa de produtos químicos, sendo importante avaliar os efeitos combinados da exposição às misturas de poluentes (Altenburguer et al., 2018; Sathishkumar et al., 2019).

Nas últimas décadas, tem sido amplamente divulgada a presença de diferentes tipos de medicamentos em águas superficiais em todo o mundo, principalmente anti-inflamatórios não esteroides (AINEs), psiquiátricos,



cardiovasculares, hipocolesterolêmicos, hormônios esteroides e antibióticos (Mezzelani et al., 2018). Da mesma forma, já foram relatadas concentrações ambientalmente relevantes de ansiolíticos, antipiréticos e estimulantes, analgésicos e anti-inflamatórios, antibióticos, antidiabéticos e betabloqueadores, reguladores lipídicos, hormônios e antidepressivos nos corpos d'água brasileiros (Quadra et al., 2017; Starling et al., 2019).

No estado de São Paulo (Brasil) é encontrado o maior número de estudos sobre a presença de drogas em corpos d'água no Brasil (Quadra et al., 2017; Montagner et al., 2019), incluindo dois dos maiores reservatórios da Região Metropolitana de São Paulo (RMSP) (Billings e Guarapiranga), cuja principal função é fornecer água a essa metrópole. Dentre os diferentes compostos farmacológicos, pode-se destacar o diclofenaco (DCF) e a cafeína (CAF) como compostos que se encontram em maior concentração (Almeida e Weber, 2005; López-Doval et al., 2017; Shihomatsu et al., 2017).

O DCF é um anti-inflamatório não esteroidal cujo mecanismo de ação envolve a inibição das enzimas ciclooxigenases (COX-1 e COX-2), que participam da síntese de prostaglandinas a partir do ácido araquidônico (Stepanova et al., 2013). Este composto é uma molécula pequena com baixo coeficiente de partição ( $Kow = 0,7$ ) (Hoeger et al., 2005), o que o torna mais persistente na água devido à sua hidrofilicidade e estabilidade (Sathishkumar et al., 2019).

A ação tóxica desse fármaco já foi observada em diferentes grupos de seres vivos, como aves, mamíferos, organismos aquáticos e plantas (Sathishkumar et al., 2019). Mesmo em concentrações ambientais, o DCF causou alterações morfológicas nas brânquias e nos rins de *Oncorhynchus mykiss* (Scwaiger et al., 2004), estresse oxidativo em *Cyprinus carpio* (Stepanova et al., 2013), danos no DNA em *Rhamdia quelen* (Guiloski et al., 2017) e em *Oreochromis niloticus*, (Pandey et al., 2017), além de alterações histológicas nas brânquias e desregulação endócrina em *O. niloticus* (Gröner et al., 2017). No entanto, a maioria dos estudos ecotoxicológicos com DCF é conduzido em exposições agudas, sendo necessárias informações sobre o efeito crônico dessa substância, simulando o que ocorre no ambiente (Sathishkumar et al., 2019).

A CAF, apesar de ser encontrada nas principais águas superficiais do mundo (Quadra et al., 2017), seus efeitos tóxicos têm sido menos estudados em organismos aquáticos, quando comparada ao DCF. A CAF é utilizada como psicoestimulante e seu principal mecanismo de ação é o antagonismo do receptor de adenosina; no entanto, concentrações mais altas desse composto também podem gerar mobilização intracelular de cálcio e inibição da fosfodiesterase (Nehlig et al., 1992; Cappelletti et al., 2015).

Os efeitos crônicos da CAF, em concentrações ambientalmente relevantes, nos organismos são escassos. A exposição à CAF por 7 dias pode interferir na atividade da enzima EROD (do inglês, Ethoxyresorufin-O-deethylase) no cérebro e no fígado de *Prochilodus lineatus* (Santos-Silva et al., 2018), enquanto que dietas com baixa porcentagem de CAF em *Sparus aurata* (< 5 % por 115 dias; Chatzifotis et al., 2008) e *O. niloticus* (< 8 % por 20 dias; Zheng et al., 2015) diminuíram o crescimento desses organismos. Entretanto, Baldissera et al. (2019) observaram que a inclusão de CAF (8 %) na dieta de *O. niloticus* ajudou a prevenir danos hepáticos ocasionados pelo estresse oxidativo em condições de hipóxia.

Os efeitos da combinação destes compostos foram analisados apenas por Lawrence et al. (2011), que avaliaram o efeito de DCF e CAF, por oito semanas no crescimento de comunidades em biofilmes no rio, encontrando uma diminuição tanto na biomassa quanto na composição dessa comunidade. Godoi et al. (2020) analisaram o efeito dessa mistura em variáveis reprodutivas no teleósteo *Astyanax altiparanae* por 96 h, observando que esses fármacos atuam como desreguladores endócrinos, diminuindo a concentração plasmática de  $17\beta$ -estradiol, sendo que o DCF isolado ainda diminuiu a concentração plasmática de testosterona, porém a mistura desses fármacos eliminou esse efeito disruptivo. Muñoz-Peñuela et al. (2021), avaliaram biomarcadores de estresse oxidativo e genotoxicidade nesta última espécie exposta também ao DCF e CAF separados e combinados por 96 h, e observaram que ambos fármacos alteraram as atividades das enzimas antioxidantes hepáticas dos organismos, porém, só a CAF gerou LPO.

Frente à essa problemática, ainda são necessárias informações sobre o efeito crônico destes compostos, isolados e misturados, pois ambos estão

presentes mundialmente no ambiente aquático. Os peixes são organismos ideais para estudos ecotoxicológicos, pois podem estar em posição intermediária da cadeia alimentar, podendo ser um indicador indireto de toxicidade para outras espécies (Gómes-Martínez, 2011). O gênero *Astyanax* vem sendo amplamente utilizado como modelo para estudos ecotoxicológicos na América Latina (Tincani et al., 2019), devido à sua presença em diferentes ambientes e tamanho pequeno, o que permite fácil manuseio em aquários e gerenciamento laboratorial (Pinheiro et al., 2019). Com base no exposto, o objetivo do presente estudo foi avaliar as respostas neurotóxicas, antioxidantes e genotóxicas de machos de *Astyanax altiparanae* frente à exposição subcrônica, a concentrações ambientalmente relevantes de DCF e CAF, combinados ou separados.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1. Animais**

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética Animal da Universidade de São Paulo (Protocolo 275/2017). Machos de *A. altiparanae* foram cedidos pela Estação de Hidrobiologia e Aquicultura de Paraibuna, pertencente à Companhia Energética de São Paulo (CESP), localizada no município de Paraibuna, SP.

### **2.2. Fármacos**

Os fármacos avaliados no presente estudo foram obtidos da Sigma Aldrich: diclofenaco sódico (D6899) (pureza  $\geq 98\%$ ) e cafeína (C0750) (pureza  $\geq 98\%$ ). Ambos os fármacos foram diluídos em água deionizada segundo as instruções do fabricante.

### 2.3. Desenho experimental

Os machos adultos de *A. altiparanae* (massa corpórea:  $25,21 \pm 0,60$  g e comprimento total:  $11,86 \pm 0,07$  cm), foram mantidos no Biotério de Ectotérmicos do Departamento de Fisiologia – IB/USP em aquários de vidro de 120 L (densidade: 1 peixe  $10 \text{ L}^{-1}$ ) durante 14 dias antes da realização do estudo. Durante este período, os animais foram alimentados diariamente *ad libitum* com ração extrusada e foi renovada 75% da água a cada 48 h, a fim de manter a qualidade desta.

Para o bioensaio subcrônico, os animais ( $n = 24$  por tratamento) foram expostos por 14 dias a quatro tratamentos experimentais: CTR (sem adição de fármacos), DCF ( $0,4 \mu\text{g L}^{-1}$ ), CAF ( $27,5 \mu\text{g L}^{-1}$ ) e DCF + CAF ( $0,4 \mu\text{g L}^{-1}$  de DCF e  $27,5 \mu\text{g L}^{-1}$  de CAF). Essas concentrações foram adotadas de acordo com as concentrações ambientais máximas encontradas em dois dos maiores reservatórios da Região Metropolitana de São Paulo (Brasil): Billings e Guarapiranga (Almeida e Weber, 2005; Shihomatsu et al., 2017). A renovação da água, bem como a reposição dos fármacos, foi realizada a cada 48 h, de acordo aos resultados do teste de decaimento realizado para estes compostos em condições experimentais do estudo (DCF: 2,76% e CAF: 5,82%). Durante todo o experimento, foram mensurados os parâmetros físico-químicos da água como temperatura ( $24,10 \pm 0,06$  °C), pH ( $7,58 \pm 0,02$ ), oxigênio dissolvido ( $6,87 \pm 0,02$  mg  $\text{L}^{-1}$ ). O fotoperíodo foi mantido em 12 luz :12 escuro e os animais foram alimentados diariamente *ad libitum* com ração extrusada.

### 2.4. Análise da concentração dos fármacos na água

Para as análises de concentração de fármacos, amostras de água foram coletadas com filtros de 45  $\mu\text{m}$  e armazenadas em frascos âmbar a 10 °C até a análise no Centro de Espectrometria de Massas Aplicada do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares da USP. As análises foram realizadas com o método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) acoplada a um analisador de Espectrometria de Massas do tipo Triplo Quadrupolo (EM/EM), usando uma coluna

1260 (Agilent Technologies, EUA) Luna C18 HST (2) (100 × 2 mm; 2,5 µm) (Phenomenex) a 35° C combinada com um espectrômetro de massa 3200QTRAP (MS-MS) (ABSciex). O volume da amostra injetada foi de 5 µL para CAF e 10 µL para DCF, a taxa de fluxo do eluente foi de 220 µL min<sup>-1</sup> e a fase móvel foi de 0,1% de ácido fórmico (Sigma-Aldrich LC-MS) em água ultrapura (solvente A) e 0,1% de fórmico ácido em acetonitrila (JT Baker LC-MS Grade) (solvente B). Para o solvente A o equilíbrio do eluente foi de 80% e para o solvente B foi de 20% em 2,30 minutos de execução.

Os analitos foram detectados e quantificados usando o modo de ionização ESI e monitoramento de reação múltipla (MRM). A linearidade para ambos os fármacos foi  $r = 0,99$ , o limite de detecção foi de 0,004 µg L<sup>-1</sup> para DCF e 1,5 µg L<sup>-1</sup> para CAF e o limite de quantificação para DCF foi de 0,014 µg L<sup>-1</sup> e para CAF foi de 5,1 µg L<sup>-1</sup>. Os dados foram registrados e processados no Analyst® 1.5.2 (ABSciex). As concentrações reais dos fármacos durante o experimento foram: 0,59 ± 0,03 µg L<sup>-1</sup> de DCF, 26,10 ± 1,20 µg L<sup>-1</sup> de CAF, e no tratamento da mistura (DCF + CAF) foi de 0,47 ± 0,00 µg L<sup>-1</sup> e 24,30 ± 0,05 µg L<sup>-1</sup>, respectivamente. O detalhamento assim como os laudos das análises encontra-se no anexo 4.

## 2.5. Coleta das amostras

Os animais foram anestesiados com 0,1 % de benzocaína previamente diluída em 10 mL de etanol absoluto. Após a anestesia, o sangue foi coletado através da punção da vasculatura caudal. Imediatamente foram coletados 10 µL de sangue em 1 mL de tampão de criopreservação (250 mM sacarose, 40 mM citrato trisódico, 5 % dimetil sulfóxido (DMSO), pH 7,6, ajustado com 1 M de ácido cítrico) e armazenados em nitrogênio líquido até o processamento do teste cometa (Evrard et al., 2010). Para as análises de micronúcleo e anormalidades nucleares foram realizados esfregaços com 5 µL de sangue sobre lâminas para microscopia (duplicata), as quais permaneceram secando durante 24 h antes da fixação com metanol absoluto durante 10 minutos. Após a coleta de sangue, foram registrados os dados morfométricos. Os animais foram eutanasiados por secção da medula

espinhal na altura do opérculo para coletar amostras de cérebro, filamentos das brânquias, fígado e músculo, que foram mantidas em freezer -80 °C até o processamento.

## 2.6. Análises das atividades da AChE e COX

A atividade da acetilcolinesterase (AChE) foi analisada no cérebro e músculo seguindo o método descrito por Ellman et al. (1961) e modificado por Alves-Costa et al. (2007). Os tecidos foram homogeneizados em tampão fosfato de potássio (0,1 M; pH 7,5; 1:10 w v<sup>-1</sup>), centrifugados a 15000 x g durante 20 minutos a 4 °C. A atividade da AChE foi avaliada em espectrofotômetro, em 415 nm (25 °C) e expressa em nmol min<sup>-1</sup> mg proteína<sup>-1</sup>. A determinação da proteína foi feita de acordo com o método descrito por Lowry et al. (1951), utilizando como padrão a albumina sérica bovina e leitura no espectrofotômetro em 660 nm. A atividade da enzima cicloxigenase (COX) hepática foi realizada utilizando kit colorimétrico (Cayman Chemical ® N°760151). A atividade foi expressa em nmol min<sup>-1</sup> mL<sup>-1</sup>.

## 2.7. Biomarcadores de estresse oxidativo

Amostras de brânquias e fígado foram homogeneizadas em tampão fosfato de potássio (0,1 M; pH 7,0; 1:10 w v<sup>-1</sup> para fígado e 1:5 w v<sup>-1</sup> para brânquias) e centrifugadas a 15000 x g durante 20 minutos a 4 °C para análises das enzimas superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase (GPx), catalase (CAT) e glutatona S-transferase (GST).

A atividade da SOD foi quantificada seguindo o método de McCord e Fridovich (1969), lendo a absorbância a 550 nm (25 °C) em um espectrofotômetro. A SOD presente na amostra inibe a redução do citocromo C fornecida pelo ânion superóxido do sistema xantina/xantina oxidase. O resultado foi expresso em U de SOD mg da proteína<sup>-1</sup>, que representa a quantidade de SOD que promove 50% de inibição da taxa de redução do citocromo C. A atividade da GPx foi quantificada de acordo com o método de Hopkins e Tudhope (1973), estimando a atividade através

da oxidação de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) na presença de  $H_2O_2$ , em espectrofotômetro a 340 nm (25 °C). A atividade foi expressa em  $\mu\text{mol}$  de NADPH oxidado  $\text{min}^{-1}$  mg de proteína $^{-1}$ . A atividade da CAT foi quantificada pela taxa de decomposição de  $H_2O_2$  pela enzima de acordo com o método de Beutler et al. (1975). A leitura foi realizada no espectrofotômetro a 240 nm (25 °C) e o resultado expresso em  $\mu\text{mol}$  de  $H_2O_2$  metabolizado  $\text{min}^{-1}$  mg de proteína $^{-1}$ . A atividade da GST foi quantificada seguindo o método de Habig et al. (1974), medindo a conjugação de GSH com 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) em um espectrofotômetro a 340 nm (25 °C), com o resultado expresso em  $\text{nmol min}^{-1}$  mg de proteína $^{-1}$ .

A quantificação da concentração de proteínas nas brânquias e fígado foi a mesma já descrita para cérebro e músculo. Finalmente, a lipoperoxidação (LPO) foi analisada pelo método de FOX (método de oxidação ferrosa / laranja de xilenol) adaptado por Hermes-Lima et al. (1995). Os hidroperóxidos lipídicos foram expressos como equivalentes de hidroperóxidos de cumeno (CHP)  $\text{g}^{-1}$  de peso úmido. Todas as medições foram realizadas em um leitor de microplacas (SpectraMax 190, Molecular Devices).

## 2.8. Análises de genotoxicidade

O teste cometa foi realizado seguindo o método descrito por Singh et al. (1988). O sangue foi descongelado, armazenado no tampão de criopreservação e 10  $\mu\text{L}$  foram adicionados a 120  $\mu\text{L}$  de agarose de baixo ponto de fusão para homogeneização. Posteriormente, três gotas do homogeneizado foram espalhadas em uma lâmina previamente coberta com agarose (1 % em PBS) e coberto com uma lamínula (duas lâminas por peixe), as quais foram mantidas na geladeira a 4 °C durante 50 minutos. Após transcorrido este tempo, as lamínulas foram retiradas e as lâminas foram submetidas aos seguintes processos: 1) lise por 1 h, a 4°C e protegidas da luz em solução de lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 10 % DMSO, 1 % TRITON X-100, 0.01 M lauril sarcosinato de sódio); 2) desnaturação do DNA por 30 min imersas em tampão de eletroforese no escuro (300 mM NaOH, 100 mM EDTA, pH 13); 3) eletroforese por 20 minutos a 300 mA e a 1 V por

centímetro de comprimento da cuba utilizada; 4) três lavagens com solução de neutralização (0,4 M Tris). Após a secagem das lâminas, estas foram fixadas em etanol absoluto por 10 minutos.

Para a contagem e classificação das células, 50 µL de GelRed (Biotium) foi depositado em cada lâmina e contadas 100 células por lâmina em microscópio de fluorescência (400x). As células foram classificadas segundo Collins et al. (2008): classe 0= sem dano aparente, classe 1= comprimento da cauda menor do que o diâmetro do nucleóide, classe 2= comprimento da cauda igual ao diâmetro do nucleóide, classe 3= comprimento da cauda maior do que o diâmetro do nucleóide. Os scores de cada grupo experimental foram calculados multiplicando o número dos nucleóides visualizados em cada classe pelo valor da classe (0, 1, 2 ou 3).

Para o teste de micronúcleo (MN) e anormalidades nucleares (ANs), as lâminas fixadas foram coradas com Giemsa (10%) e examinadas em microscopia de luz (1000x), contando 2000 eritrócitos por animal. O teste de micronúcleo foi realizado de acordo com o método descrito por Al-Sabti e Metcalfe (1995) e o teste de anormalidades segundo Carrasco et al. (1990).

## 2.9. Análises estatísticas

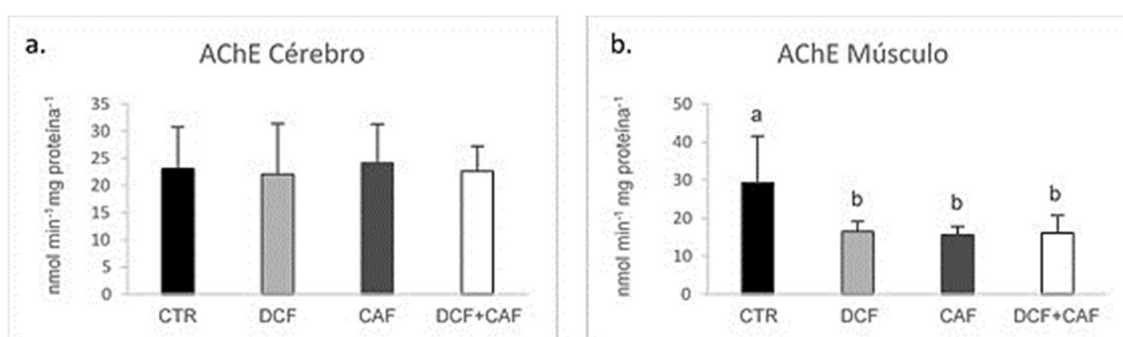
Para avaliar as diferenças das respostas fisiológicas entre os tratamentos foi utilizado o teste de Análise de Variância *one-way* ANOVA. A normalidade foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilks e a homogeneidade de variância através do teste de Bartlett. Para os dados paramétricos foi utilizado o teste post hoc de Tukey (massa, IVS, IHS, SOD, GPx e GST na brânquia, SOD, GPx, CAT, GST e LPO no fígado). Para os dados não paramétricos foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn (comprimento, AChE - cérebro e músculo, COX, CAT, e LPO na brânquia, teste cometa e teste de Micronúcleo e Anormalidades Nucleares). Em todos os casos foi considerado um nível de significância de 0,05 como estatisticamente significativo. Foi usado GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA) para todas as análises estatísticas.



### 3. Resultados

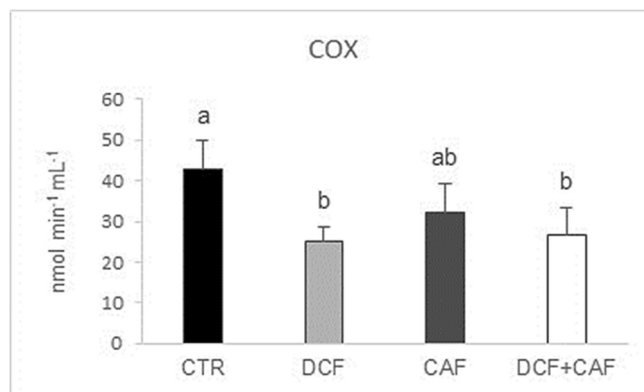
#### 3.1. Atividades das enzimas AChE e COX

O DCF e a CAF, isolados ou combinados, não apresentaram nenhum efeito sobre a atividade da AChE no cérebro dos animais (Figura 1a,  $P = 0,86$ ), enquanto no músculo, tanto DCF como CAF, isolados e combinados, inibiram a atividade desta enzima (Figura 1b,  $P = 0,002$ ).



**Figura 1:** Atividade da acetilcolinesterase (AChE) no c\u00e9rebro (a) e no m\u00fasculo (b) de machos de *A. altiparanae* nos tratamentos controle (CTR), diclofenaco (DCF), cafe\u00edna (CAF) e diclofenaco + cafe\u00edna (DCF+CAF) ap\u00f3s 14 dias de exposi\u00e7\u00e3o (M\u00e9dia  $\pm$  Desvio Padr\u00e3o).  $n = 10$ . <sup>ab</sup> Letras diferentes representam diferen\u00e7as estat\u00edsticas significativas entre os tratamentos ( $P < 0,05$ ).

Com rela\u00e7\u00e3o \u00e0 atividade da COX, os animais expostos ao DCF, separado e combinado com a CAF, apresentaram menores atividades desta enzima comparado com os animais do grupo CTR, por\u00e9m, a CAF separada n\u00e3o apresentou nenhum efeito (Figura 2,  $P = 0,01$ ).

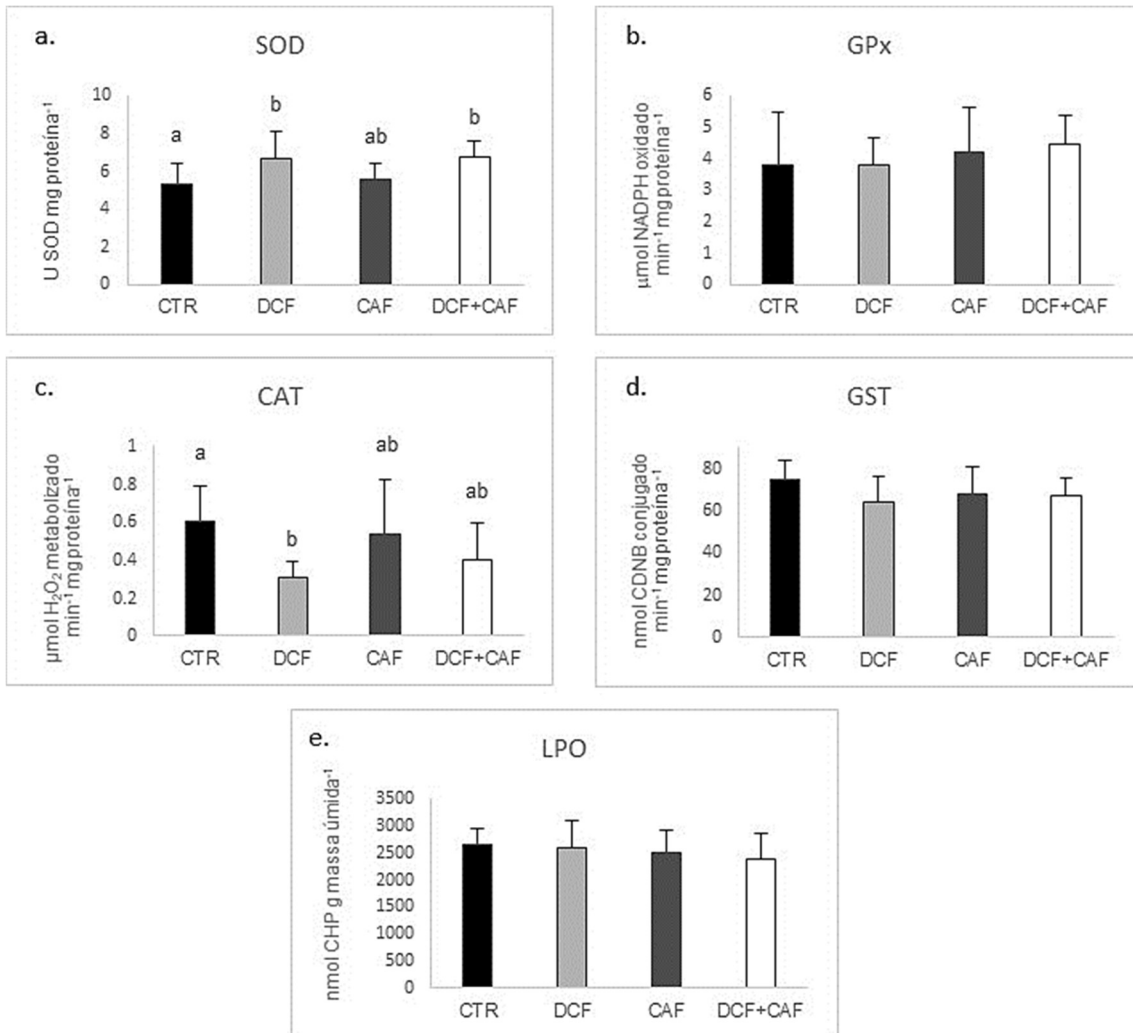


**Figura 2:** Atividade da ciclooxigenase (COX) no fígado de machos de *A. altiparanae* nos tratamentos controle (CTR), diclofenaco (DCF), cafeína (CAF) e diclofenaco + cafeína (DCF+CAF) após 14 dias de exposição (Média ± Desvio Padrão). n = 5. <sup>ab</sup> Letras diferentes representam diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos ( $P < 0,05$ ).

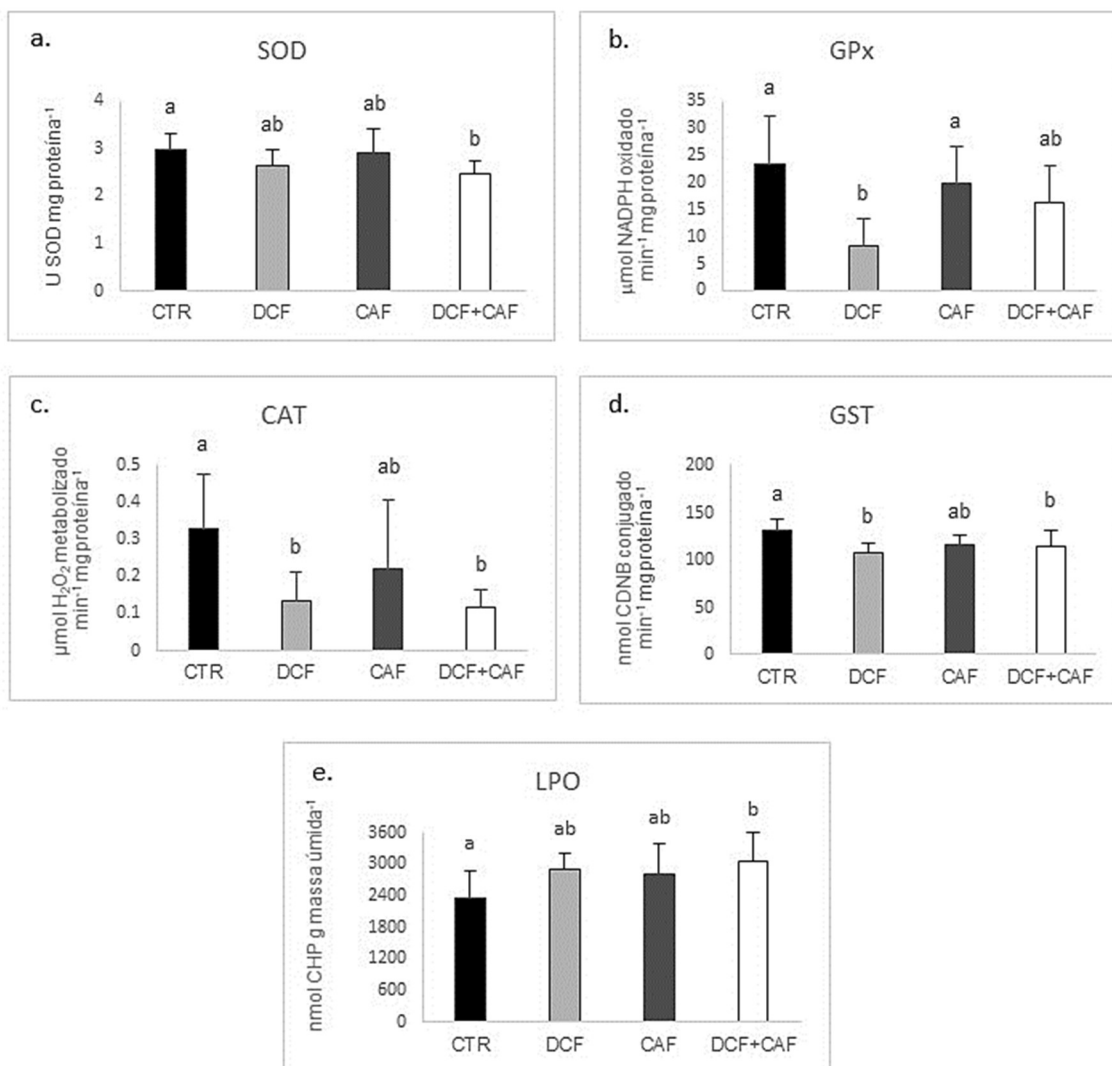
### 3.2. Biomarcadores de estresse oxidativo

A atividade da enzima SOD aumentou nas brânquias dos peixes expostos ao DCF separado e combinado com a CAF (Figura 3a,  $P = 0,009$ ), enquanto a atividade da enzima CAT foi inibida nos animais expostos ao DCF (Figura 3c,  $P = 0,009$ ). Diferente das enzimas anteriores, os fármacos avaliados não alteraram a atividade da GPx (Figura 3b,  $P = 0,53$ ) e da GST (Figura 3d,  $P = 0,21$ ), assim como não foi observada lipoperoxidação (Figura 3e,  $P = 0,78$ ).

No fígado, os efeitos da exposição ao DCF estiveram relacionados com a inibição da atividade das enzimas, enquanto que a CAF isolada não apresentou nenhum efeito evidente. A atividade hepática da SOD foi inibida nos peixes expostos à mistura (DCF+CAF) em comparação com animais do grupo CTR (Figura 4a,  $P = 0,03$ ), e a atividade da GPx foi inibida nos animais do grupo DCF em relação aos peixes dos grupos CTR e CAF (Figura 4b,  $P = 0,0003$ ). A atividade hepática da CAT (Figura 4c,  $P = 0,02$ ) e da GST (Figura 4d,  $P = 0,004$ ) foram inibidas tanto nos organismos expostos ao DCF quanto naqueles expostos à mistura (DCF+CAF) em relação aos animais do grupo CTR. Os animais expostos à mistura (DCF+CAF) também apresentaram maior lipoperoxidação hepática (Figura 4e,  $P = 0,04$ ).



**Figura 3:** Biomarcadores de estresse oxidativo em brânquias de machos de *A. altiparanae* nos diferentes tratamentos: controle (CTR), diclofenaco (DCF), cafeína (CAF) e diclofenaco + cafeína (DCF+CAF) após 14 dias de exposição (Média ± Desvio Padrão). n = 10. Superóxido Dismutase (SOD) (a), Glutaciona Peroxidase (GPx) (b), Catalase (CAT) (c), Glutaciona S-Transferase (GST) (d) e Lipoperoxidação (LPO) (e). <sup>ab</sup> Letras diferentes representam diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos (P < 0,05).

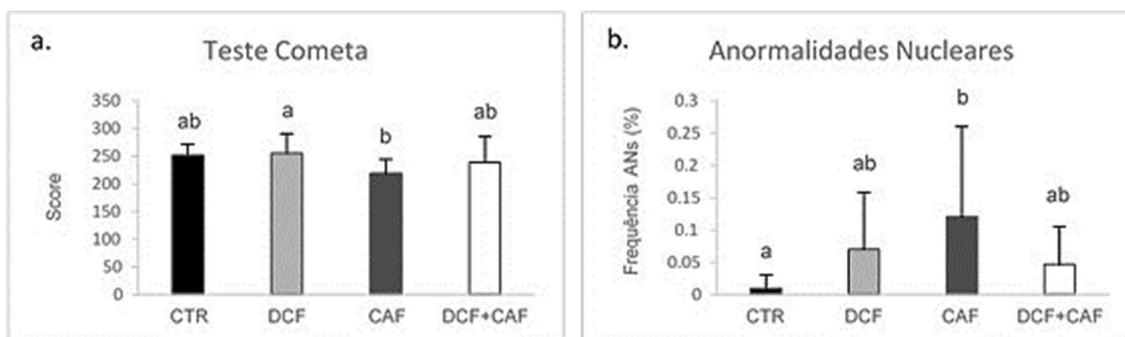


**Figura 4:** Biomarcadores de estresse oxidativo em fígado de machos de *A. altiparanae* nos diferentes tratamentos: controle (CTR), diclofenaco (DCF), cafeína (CAF) e diclofenaco + cafeína (DCF+CAF) após 14 dias de exposição (Média ± Desvio Padrão). n = 10. Superóxido Dismutase (SOD) (a), Glutaciona Peroxidase (GPx) (b), Catalase (CAT) (c), Glutaciona S-Transferase (GST) (d) e Lipoperoxidação (LPO) (e). <sup>ab</sup> Letras diferentes representam diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos (P < 0,05).

### 3.3. Biomarcadores genotóxicos

Os resultados do teste cometa demonstraram uma menor fragmentação do DNA dos peixes expostos à CAF quando comparados aos animais expostos ao DCF (Figura 5a, P = 0,02). Porém, em contraste aos resultados destas análises, os organismos expostos à CAF foram os que mostraram uma maior frequência de anormalidades nucleares quando comparados com os animais do grupo CTR

(Figura 5b,  $P = 0,004$ ). Não obstante, não foram observados micronúcleos em nenhum tratamento.



**Figura 5:** Score do dano genético quantificado pelo teste cometa (a) e Frequência de anormalidades nucleares (ANs) (b), em machos de *A. altiparanae* nos tratamentos controle (CTR), diclofenaco (DCF), cafeína (CAF) e diclofenaco + cafeína (DCF+CAF) após 14 dias de exposição (Média  $\pm$  Desvio Padrão).  $n = 10$ . <sup>ab</sup> Letras diferentes representam diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos ( $P < 0,05$ ).

#### 4. Discussão

A exposição subcrônica ao DCF isolado ou combinado com a CAF, em concentrações ambientalmente relevantes, gerou a inibição de enzimas importantes para o desempenho e sobrevivência dos organismos, como é o caso da AChE muscular, cuja inibição pode resultar em falhas na locomoção, alimentação e reprodução; e a COX hepática, que pode comprometer o sistema imunológico. Com relação aos danos oxidativos, foi possível observar uma ação do DCF (separado ou combinado com a CAF) em desencadear uma resposta antioxidante nas brânquias, avaliada pelo aumento na atividade da SOD, enquanto no fígado, o DCF (separado ou combinado com a CAF) inibiram a atividade desta enzima, assim como da CAT e GST. No entanto, só a mistura dos fármacos gerou lipoperoxidação hepática. Por outro lado, a CAF apresentou efeito inibitório na AChE muscular, assim como danos genotóxicos no sangue, que no futuro podem comprometer a saúde dos organismos e ter efeitos deletérios sobre a descendência. Em geral, a exposição combinada não mostrou efeitos aditivos, sinérgicos ou antagônicos nos biomarcadores avaliados, com exceção da lipoperoxidação hepática, que aumentou apenas quando os animais foram expostos aos fármacos combinados.

Com relação à neurotoxicidades do DCF e/ou a CAF, no presente estudo observou-se uma diferença na resposta da atividade da AChE nos dois tecidos avaliados, pois a exposição aos fármacos separadamente ou combinados não mostrou efeito no cérebro, enquanto no músculo os três tratamentos desencadearam inibição da atividade dessa enzima, sem observar um efeito maior ou menor nos peixes expostos à mistura. A atividade da enzima AChE é utilizada como biomarcador para avaliar a neurotoxicidade causada por contaminantes (Shi et al., 2019). A inibição da atividade da AChE pode ocasionar a superestimulação prolongada das fibras nervosas e musculares devido ao aumento de acetilcolina nas sinapses, conseqüentemente, afetando as atividades locomotoras e comprometendo o comportamento normal, que inclui alimentação, escape e reprodução (Colin et al., 2016).

Poucos estudos avaliram o efeito do DCF na AChE, todavia, Maulvault et al. (2018) observaram um efeito oposto no cérebro e no fígado do *Dicentrarchus labrax* alimentados por 28 dias com dietas contendo DCF, evidenciando um aumento na atividade desta enzima. Ao contrário, Chatzifotis et al. (2008) não encontraram efeito na atividade cerebral da AChE em *S. aurata* alimentados por 115 dias com uma dieta enriquecida com CAF. Adicionalmente, já foi comprovado em seres humanos que a CAF pode inibir a atividade da AChE (Pohanka e Dobes, 2013; Willson, 2018), no entanto, esta ação geralmente ocorre em doses muito altas (aproximadamente 34 mg L<sup>-1</sup>), que se tornam tóxicas em seres humanos (Willson, 2018).

Em contraste com esses relatos, neste trabalho, foi observada inibição da AChE muscular em concentrações muito baixas dos dois fármacos avaliados ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ), enquanto em um trabalho anterior do mesmo grupo de pesquisa, no qual machos de *A. altiparanae* foram expostos aos mesmos compostos em concentrações mais elevadas, consideradas subletais (mg L<sup>-1</sup>), não foi observado efeito na atividade da AChE no cérebro ou músculo (Muñoz-Peñuela et al., 2021). Estes resultados revelam informações preocupantes, pois concentrações ambientalmente relevantes de DCF e CAF podem gerar efeitos negativos na locomoção em organismos aquáticos e, portanto, afetar as atividades de alimentação, fuga e reprodução, que são vitais para a sobrevivência.

Com relação à atividade da COX, como inicialmente previsto, os peixes expostos ao DCF, separadamente e combinado com a CAF, exibiram valores mais baixos de atividade desta enzima, sugerindo que em peixes este fármaco tem o mesmo mecanismo de ação que em seres humanos (Hoeger et al., 2005; Bing-Shu et al., 2017), que é bloquear a atividade da COX, responsável por catalisar a degradação do ácido araquidônico durante a produção de prostaglandinas, a fim de aliviar a dor causada pela inflamação (Stepanova et al., 2013). Entretanto, essas moléculas desempenham um papel fundamental na resposta imune dos organismos (Gómez-Abellán e Sepulcre, 2016), de modo que a inibição a longo prazo da COX pode ter efeitos prejudiciais à saúde e manutenção da vida dos organismos aquáticos.

Os resultados do presente estudo diferem do observado por Muñoz-Peñuela et al. (2021) para a mesma espécie de teleósteo, no qual exposições de  $4 \text{ mg L}^{-1}$  durante 96 h não geraram inibição da COX, o que pode estar relacionado à alta concentração utilizada, uma vez que o DCF é um composto utilizado em doses muito baixas. Sabe-se, por exemplo, que o  $CL_{50}$  do DCF é muito menor que o do ibuprofeno e do meloxicam, outros AINEs que possuem o mesmo mecanismo de ação (Blain et al., 2002). Portanto, apesar de encontrar doses muito baixas de DCF em corpos d'água superficiais, eles podem ter efeitos mais significativos na fauna aquática do que se poderia pensar, especialmente considerando que a exposição ao ambiente é geralmente crônica. A inibição da COX, assim como da síntese de prostaglandina E2 foi observada em macrófagos renais de *Salmo trutta* expostos por até 21 dias em concentrações de 0,5, 5 e  $50 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  de DCF (Hoeger et al., 2005).

Com relação aos biomarcadores de estresse oxidativo, a exposição subcrônica à CAF não gerou nenhuma resposta nos dois órgãos avaliados, ao contrário do observado no estudo agudo (Muñoz-Peñuela et al., 2021), no qual a exposição à CAF por 96 h desencadeou LPO hepática, mas em concentração mais elevada ( $11,6 \text{ mg L}^{-1}$ ). Existem poucos estudos que avaliam o efeito da CAF em peixes e, em geral, os encontrados na literatura não concluem um efeito tóxico desse composto nos organismos. Santos-Silva et al. (2018) observaram que concentrações de 0,3, 3 e  $30 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  durante 7 dias não foram suficientes para

desencadear estresse oxidativo no fígado de *P. lineatus*. Da mesma forma, outros autores observaram que a CAF pode ter efeitos hepatoprotetores em *D. rerio* (Zheng et al., 2015) e *O. niloticus* (Baldissera et al., 2019).

Enquanto os resultados da exposição subcrônica ao DCF, separado ou combinado, em geral evidenciaram uma inibição das enzimas antioxidantes, a SOD nas brânquias apresentou aumento na sua atividade, indicando que a exposição a este fármaco pode estimular a produção de íons superóxido. No sistema antioxidante, a primeira enzima em agir é a SOD, que catalisa a dismutação de superóxido e o converte em peróxido de hidrogênio, o qual serve como substrato das enzimas CAT e GPx, que agem posteriormente para neutralizar a ação do peróxido, convertendo-o em água e oxigênio (Matés, 2000; Stepanova et al., 2013; Atli et al., 2016). No entanto, nas brânquias dos peixes expostos ao DCF (separado) foi observada uma inibição da CAT, que poderia ser causada por uma desnaturação da proteína gerada pelo excesso de peróxido de hidrogênio (Ruas et al., 2008). Apesar disso, não foi evidenciada LPO neste órgão em nenhum dos tratamentos experimentais, o que corrobora com nosso estudo prévio, no qual a exposição ao DCF e CAF por 96 horas, isolados ou combinados, não desencadeou a ativação do sistema enzimático antioxidante nas brânquias, nem gerou LPO (Muñoz-Peñuela et al., 2021).

O fígado, mostrou-se um órgão mais sensível à exposição ao DCF do que as brânquias, com inibição das enzimas antioxidantes nos peixes expostos ao DCF, semelhante ao que foi observado na exposição aguda (Muñoz-Peñuela et al., 2021), o que seria esperado, uma vez que o fígado é o órgão central do metabolismo dos xenobióticos, sendo mais susceptível aos danos oxidativos (Guiloski et al., 2017). Em geral, a inibição de enzimas antioxidantes pode favorecer o acúmulo de oxirradicais, que em combinação com o peróxido de hidrogênio, desencadeiam a formação do radical hidroxila, que afeta biomoléculas como lipídios, proteínas e ácidos nucleicos (García-Medina et al., 2017).

Tal fato foi observado no presente estudo com peixes expostos à mistura de DCF e CAF, nos quais foi observada uma maior LPO em relação aos peixes do grupo CTR, demonstrando assim um efeito aditivo na combinação de DCF com



CAF. É importante ressaltar que os peixes desse tratamento foram os únicos que apresentaram inibição da SOD, logo, é provável que tenha havido um excesso de superóxido com a exposição à mistura, desnaturando as enzimas antes que elas desempenhassem sua função antioxidante. Além disso, a inibição da enzima CAT, que atua quando ocorrem danos graves (Matés, 2000; Stepanova et al., 2013; Atli et al., 2016), e a inibição da GST que contribui para o processo de desintoxicação (Storey, 1996), foram somadas para desencadear a LPO devido ao excesso de EROs (espécies reativas de oxigênio) que o sistema antioxidante não conseguiu eliminar. A enzima GST desempenha um papel muito importante na biotransformação de produtos gerados na primeira fase de biotransformação ou nos próprios compostos xenobióticos, catalisando a conjugação destes com o tripeptídeo GSH para formar compostos mais hidrofílicos, que são excretados facilmente da célula (Storey, 1996; Santos-Silva et al., 2018).

O efeito do DCF em peixes tem sido mais estudado do que a CAF, e alguns autores já argumentam que a exposição a essa droga desencadeia a produção de EROs causando estresse oxidativo e alterando o sistema de enzimas antioxidantes (Rocco et al., 2011; Stepanova et al., 2013). Todavia, as respostas das enzimas antioxidantes à exposição ao DCF variam dependendo da espécie, do tecido e do tempo de exposição, fato que vem sendo observado em *A. altiparanae*, considerando-se as diferenças encontradas entre a exposição aguda por 96 horas (Muñoz-Peñuela et al., 2021) e subcrônica (presente estudo). Stepanova et al. (2013) observaram um aumento na atividade da GST em *C. carpio* exposta a uma alta concentração ( $3 \text{ mg L}^{-1}$ ), no entanto, embora analisassem as atividades em momentos diferentes, esse aumento foi evidenciado apenas após 30 dias de exposição. Já Guiloski et al. (2017) observaram uma inibição nas atividades das enzimas SOD e CAT no fígado de *R. quelen* como resultado à exposição de  $2 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  de DCF por 21 dias.

Finalmente, com relação aos biomarcadores de genotoxicidade, foi observada uma diminuição na fragmentação do DNA em peixes expostos a CAF em relação aos expostos ao DCF, mas não foram observadas diferenças em nenhum dos dois tratamentos em relação aos animais do grupo CTR ou na mistura

(DCF+CAF). Porém, o Score do teste cometa dos animais do grupo CTR foi alto, indicando que estes animais, assim como aqueles utilizados nos tratamentos com os fármacos, apresentaram uma alta fragmentação de DNA.

Geralmente, o teste cometa é um dos métodos mais utilizados em estudos ecotoxicológicos para avaliar genotoxicidade, por ser uma técnica sensível que detecta danos de diferentes tipos (mutações ou quebras) no DNA causados por compostos xenobióticos (Rocco et al., 2011). Em situações normais, há um equilíbrio constante entre os processos pró-oxidante e anti-oxidante, contudo, quando os organismos são expostos aos compostos que estimulam a produção de EROs, esses xenobióticos podem desencadear danos oxidativos em moléculas-chave, como lipídios, proteínas ou DNA (Livingstone, 2001). No presente estudo, embora os animais do grupo CTR não tenham sido expostos a compostos xenobióticos, é provável que tenha ocorrido outro fator estressor que interferisse com o resultado do teste cometa, sendo provável que os animais de todos os tratamentos estivessem sob estresse pelo confinamento nos aquários, deixando-os mais sensíveis e susceptíveis aos danos.

Contudo, Santos-Silva et al. (2018) também não observaram danos genotóxicos nos eritrócitos de *P. lineatus* expostos por 7 dias às concentrações ambientalmente relevantes de CAF (<20 µg L<sup>-1</sup>). Em relação ao DCF, Rocco et al. (2011) mencionam que o principal mecanismo de ação deste fármaco para induzir citotoxicidade e genotoxicidade é através do aumento do estresse oxidativo. Em geral, o dano ao DNA está fortemente relacionado às atividades das enzimas antioxidantes (Baccheta et al., 2017; Tincani et al., 2019), entretanto, no presente estudo o DCF isolado ou combinado com CAF não geraram danos citotóxicos/genotóxicos. Semelhante ao observado no presente estudo, Guiloski et al. (2017) não observaram danos genotóxicos no sangue e no fígado de *R. quelen* expostos a concentrações ambientalmente relevantes de DCF por 21 dias. No entanto, tem sido relatada genotoxicidade em *D. rerio* (Rocco et al., 2011), *Hoplias malabaricus* (Ribas et al., 2014), *O. niloticus* (Pandey et al., 2017) e *D. labrax* (Maulvault et al., 2018) expostos subcrônicamente a concentrações ambientalmente relevantes de DCF.

*A. altiparanae* é uma espécie sensível e adequada para detectar efeitos genotóxicos resultantes da exposição a compostos xenobióticos (Francisco et al., 2019), no entanto, no presente estudo, não foi possível observar danos genotóxicos nesta espécie por meio do teste do cometa, nem pela formação de MN. Sabe-se que alguns compostos promovem mais facilmente a formação de MN do que ANs ou vice-versa (Braham et al., 2017). Neste caso, um número maior de AN foi encontrado nos peixes do tratamento CAF, ao contrário do que foi observado no estudo de exposição aguda realizado com esta espécie (Muñoz-Peñuela et al., 2021). No entanto, este resultado contrasta com os resultados dos outros biomarcadores de estresse oxidativo e com o teste cometa, considerando que os animais expostos à CAF não apresentaram alterações no sistema enzimático antioxidante, bem como LPO ou fragmentação de DNA. Portanto, sugere-se que a exposição à CAF tenha desencadeado a formação de EROs e, como não houve ativação do sistema de defesa, foram gerados danos diretos ao material genético. Já em estudos *in vitro* com linfócitos humanos, foi comprovado que baixas concentrações de CAF podem afetar a replicação do DNA, causar aberrações cromossômicas e divisões celulares assimétricas (Hatzi et al., 2015). Em relação ao DCF, embora existam antecedentes de genotoxicidade e aumento na formação de MN em *D. labrax* (Maulvault et al., 2018), este fármaco não mostrou efeito genotóxico em *A. altiparanae*.

## 5. Conclusão

Os resultados do presente estudo permitem concluir que a exposição prolongada às concentrações ambientalmente relevantes de DCF e CAF, separados ou combinados, inibe a atividades de enzimas de vital importância para manter a homeostase de machos adultos de *A. altiparanae*, gerando danos às membranas lipídicas hepáticas quando os animais estão expostos à mistura dos compostos, e danos genotóxicos com a exposição à CAF de forma isolada, comprometendo a saúde dos organismos.

## **Agradecimentos**

Este estudo teve o suporte financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (processos: 2017/11530-1 e 2014/16320-7), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (152753/2017-6) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - (CAPES) - Código de financiamento 001. Além disso, os autores agradecem a doação dos animais pela Estação de Hidrobiologia e Aquicultura de Paraibuna, pertencente à Companhia Energética de São Paulo – CESP, no município de Paraibuna – SP, à equipe de LAMEROA (IB-USP) pelo suporte, ao Laboratório de Evolução e Desenvolvimento de Invertebrados (Prof. Dr. Federico Brown) da Universidade de São Paulo (IB-USP) por emprestar o microscópio de fluorescência e ao IB-USP pela logística e facilidades.

## **Referências**

- Acuña, V., Ginebreda, A., Mor, J.R., Petrovic, M., Sabater, S., Sumpter, J., Barceló, D. 2015. Balancing the health benefits and environmental risks of pharmaceuticals: Diclofenac as an example. *Environment International* 85, 327–333.
- Almeida, G.A., Weber, R.R. 2005. Fármacos na represa Billings. *Revista Saúde e Ambiente* 6, 7-13.
- Al-Sabti, K., Metcalfe, C.D. 1995. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutation Research* 343, 121–135.
- Altenburger, R., Scholze, M., Busch, W., Escher, B.I., Jakobs, G., Krauss, M., Kruger, J., Neale, P.A., Ait-Aissa, S., Almeida, A.C., Seiler, T.B., Brion, F., Hilscherova, K., Hollert, H., Novak, J., Schlichting, R., Serra, H., Shao, Y., Tindall, A., Tollefsen, K.E., Umbuzeiro, G., Williams, T.D., Kortenkamp, A. 2018. Mixture effects in samples of multiple contaminants – An inter-laboratory study with manifold bioassays. *Environment International* 114, 95–106.

- Alves-Costa, J.R.M., Mela, M., Silva de Assis, H.C., Pelletier, E., Randi, M.A.F., Oliveira Ribeiro, C.A., 2007. Enzymatic inhibition and morphological changes in *Hoplias malabaricus* from dietary exposure to lead (II) or methylmercury. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 67, 82–88.
- Atli, G., Canli, E.G., Eroglu, A., Canli, M. 2016. Characterization of antioxidant system parameters in four freshwater fish species. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 126, 30-37.
- Bacchetta, C., Ale, A., Simoniello, M.F., Gervasio, S., Davico, C.S., Rossi, A.S., Desimone, M.F., Poletta, G., López, G., Monserrat, J.M., Cazenave, J. 2017. Genotoxicity and oxidative stress in fish after a short-term exposure to silver nanoparticles. *Ecological Indicators* 76, 230–239.
- Baldissera, M.D., Souza, C.F., Descovi, S.N., Petrolli, T.G., da Silva, A.S., Baldisserotto, B. 2019. A caffeine-supplemented diet modulates oxidative stress markers and prevents oxidative damage in the livers of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to hypoxia. *Fish Physiology and Biochemistry* 45 (3), 1041-1049.
- Beutler, E. 1975. Catalase. In E. Beutler (Ed.), *Red Cell Metabolism. A manual of biochemical methods*. New York: Grune and Stratton. P. 89-90.
- Bing-Shu, H., Jun, W., Juan, L., Xia-Min, H. 2017. Eco-pharmacovigilance of non-steroidal anti-inflammatory drugs: Necessity and opportunities. *Chemosphere* 181, 178-189.
- Blain, H., Boileau, C., Lapocque, F., Nédelec, E., Loeuille, D., Guollaume, C., Gaucher, A., Jeandel, C., Netter, P., Jouzeau, J.Y. 2002. Limitation of the *in vitro* whole blood assay for predicting the COX selectivity of NSAIDs in clinical use. *Clinical Pharmacology* 53, 255-265.
- Braham, R.P., Blazer, V.S., Shaw, C.H., Mazik, P.M. 2017. Micronuclei and other erythrocyte nuclear abnormalities in fishes from the great lakes basin, USA. *Environmental and molecular mutagenesis* 58, 570-581.
- Cappelletti, S., Daria, P., Sani, G., Aromatario, M. 2015. Caffeine: Cognitive and physical performance enhancer or psychoactive drug? *Current Neuropharmacology* 13, 71-88.

- Carrasco, K.R., Tilbury, K.L., Myers, M.S. 1990. Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science* 47, 2123–2136.
- Chatzifotis, S., Kokou, F., Ampatzis, K., Papadakis, I.E., Divanach, P., Dermon, C.R. 2008. Effect of dietary caffeine on growth, body composition, somatic index, and cerebral distribution of acetyl-cholinesterase and nitric oxide synthase in gilthead sea bream (*Sparus aurata*), reared in winter temperature. *Aquaculture Nutrition* 14, 405-415.
- Colin, N., Porte, C., Fernandes, D., Barata, C., Padrós, F., Carrassón, M., Monroy, M., Cano-Rocabayera, O., de Sosto, A., Piña, B., Maceda-Veiga, A. 2016. Ecological relevance of biomarkers in monitoring studies of macro-invertebrates and fish in Mediterranean rivers. *Science of the Total Environment* 540, 307–323.
- Collins, AR., Oscoz, A.A., Brunborg, G., Gaivão, I., Giovannelli, L., Kruszewski, M., Smith, C.C., Štětina, R. 2008. The comet assay: topical issues. *Mutagenesis* 23 (3), 143–151.
- Cooper, E.R., Siewicki, T.C., Phillips, K. 2008. Preliminary risk assessment database and risk ranking of pharmaceuticals in the environment. *Science of the Total Environment* 398, 26-33.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, J.R.V., Featherstone, R.M. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemistry and Pharmacology* 7, 88-95.
- Evrard, E., Devaux, A., Bony, S., Burgeot, T., Riso, R., Budzinski, H., Le Du, M., Quiniou, L., Laroche, J. 2010. Responses of the European Flounder *Platichthys flesus* to the Chemical Stress in Estuaries: Load of Contaminants, Gene Expression, Cellular Impact and Growth Rate. *Biomarkers* 15 (2), 111-127.
- Francisco, C.M., Bertolino, S.M., de Oliveira Júnior, R.J., Morelli, S., Pereira, B.B. 2019. Genotoxicity assessment of polluted urban streams using a native fish *Astyanax altiparanae*. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* 82 (8), 514–523.
- García-Medina, S., Galar-Martínez, M., Gómez-Oliván, L.M., Ruiz-Lara, C., Islas-Flores, H., Gasca-Pérez, E. 2017. Relationship between genotoxicity and

- oxidative stress induced by mercury on common carp (*Cyprinus carpio*) tissues. *Aquatic Toxicology* 192, 207–215.
- Gimeno, P., Severyns, J., Acuña, B.V., Comas, J., Corominas, L. 2018. Balancing environmental quality standards and infrastructure upgrade costs for the reduction of microcontaminant loads in rivers. *Water Research* 143, 632-641.
- Godoi, F.G.A., Muñoz-Peñuela, M., Gomes, A.D.O., Tolussi, C.E., Brambila-Souza, G., Branco, G.S., Lo Nostro, F.L., Moreira, R.G. 2020. Endocrine disruptive action of diclofenac and caffeine on *Astyanax altiparanae* males (Teleostei: Characiformes: Characidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology* 231, 108720.
- Gómez-Abellán, V., Sepulcre, M.P. 2016. The role of prostaglandins in the regulation of fish immunity. *Molecular Immunology* 69, 139-145.
- Gomes-Martinez, L. 2011. Disposition kinetics of caffeine and paraxanthine in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): Characterization of the main metabolites. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 60, 654–664.
- Gröner, F., Höhne, C., Kleiner, W., Kloas, W. 2017. Chronic diclofenac exposure affects gill integrity and pituitary gene expression and displays estrogenic activity in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Chemosphere* 166, 473-481.
- Guiloski I.C., Piancini, L.D.S., Dagostim, A.C., Calado, S.L.M., Fávaro, L.F., Boschen, S.L., Cestari, M.M., Cunha, C., Assis, H.C.S. 2017. Effects of Environmentally Relevant Concentrations of the Anti-Inflammatory Drug Diclofenac in Freshwater Fish *Rhamdia quelen*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 139, 291-300.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B. 1974. Glutathione S-Transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry* 249 (22), 7130-7139.
- Hatzi, V.I., Karakosta, M., Barszczewska, K., Karachristou, I., Pantelias, G., Terzoudi, G.I. 2015. Low concentrations of caffeine induce asymmetric cell division as observed in vitro by means of the CBMN-assay and iFISH. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 793, 71.78.

- Hermes-Lima, M., Willmore, W.G., Storey, K.B. 1995. Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe (III) xylenol orange complex formation. *Free Radical Biology and Medicine* 19 (3), 271-280.
- Hoeger, B., Köllner, B., Dietrich, D.R., Hitzfeld, B. 2005. Water-borne diclofenac affects kidney and gill integrity and selected immune parameters in brown trout (*Salmo trutta* F. fario). *Aquatic Toxicology* 75, 53-64.
- Hopkins, J., Tudhope, G. R. 1973. Glutathione peroxidase in human red cells in health and disease. *Journal of Haematology* 25, 563-575.
- Lawrence, J.R., Zhu, B., Swerhone, G.D.W., Roy, J., Tumber, V., Waiser, M.J., Topp, E., Korber, D.R. 2011. Molecular and microscopic assessment of the effects of caffeine, acetaminophen, diclofenac, and their mixtures on river biofilm communities. *Environmental Toxicology and Chemistry* 31 (3), 508–517.
- Livingstone, D.R. 2001. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Marine Pollution Bulletin* 42 (8), 656-666.
- López-Doval, J.C., Montagner, C.C., de Albuquerque, A.F., Moschini-Carlos, V., Umbuzeiro, G., Pompêo, M. 2017. Nutrients, emerging pollutants and pesticides in a tropical urban reservoir: Spatial distributions and risk assessment. *Science of the Total Environment* 575, 1307–1324.
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biology Chemistry* 193, 265-275.
- Matés, J.M. 2000. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology* 153, 83-104.
- Maulvault, A.L., Barbosa, V., Alves, R., Anacleto, P., Camacho, C., Cunha, S., Fernandes, J.O., Ferreira, P.P., Rosa, R., Marques, A., Diniz, M. 2018. Integrated multi-biomarker responses of juvenile seabass to diclofenac, warming and acidification co-exposure. *Aquatic Toxicology* 202, 65-79.
- McCord, J.E. Fridovich, I. 1969. Superoxide dismutase an enzymatic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *Journal of Biological Chemistry* 244, 6049-6055.



- Mezzelani, M., Gorbi, S., Regoli, F. 2018. Pharmaceuticals in the aquatic environments: Evidence of emerged threat and future challenges for marine organisms. *Marine Environmental Research* 140, 41–60.
- Montagner, C., Sodr e, F., Acayaba, R., Vidal, C., Campestrini, I., Locatelli, M., Pescara, I., Albuquerque, A., Umbuzeiro, G., Jardim, W. 2019. Ten years-snapshot of the occurrence of emerging contaminants in drinking, surface and ground waters and wastewaters from São Paulo State, Brazil. *Journal of Brazilian Chemistry Society* 30, 614–632.
- Muñoz-Peñuela, M., Lo Nostro F., Gomes, A.D.O., Tolussi, C.E., Branco, G.S., Pinheiro, J.P.S., Godoi, F.G.A., Moreira, R.G. 2021. O diclofenaco e a cafeína inibem as enzimas do sistema antioxidante hepático no peixe de água doce *Astyanax altiparanae* (Teleostei: Characiformes). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology* 240, 108910.
- Nehlig, A., Daval, J.L., Debry, G. 1992. Caffeine and the central nervous system: mechanisms of action, biochemical, metabolic and psychostimulant effects. *Brain Research Reviews* 17, 139-170.
- Pandey, P.K., Ajima, M.N.O., Kumar, K., Poojary, N., Kumar, S. 2017. Evaluation of DNA damage and physiological responses in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) exposed to sub-lethal diclofenac (DCF). *Aquatic Toxicology* 186, 205-214.
- Pinheiro, J.P.S., Assis, C.B., Muñoz-Peñuela, M., Barbosa Júnior, F., Correia, T.G., Moreira, R.G. 2019. Water temperature and acid pH influence the cytotoxic and genotoxic effects of aluminum in the freshwater teleost *Astyanax altiparanae* (Teleostei: Characidae). *Chemosphere* 220, 266-274.
- Pohanka, M., Dobes, P. 2013. Caffeine Inhibits Acetylcholinesterase, but not butyrylcholinesterase. *International Journal of Molecular Sciences* 14, 9873-9882.
- Quadra, G.R., Souza, H.O., Costa, R.S., Fernandez, M.A.S. 2017. Do pharmaceuticals reach and affect the aquatic ecosystems in Brazil? A critical review of current studies in a developing country. *Environmental Science and Pollution Research* 24, 1200–1218.

- Ribas, J.L., da Silva, C.A., de Andrade, L., Galvan, G.L., Cestari, M.M., Trindade, E.S., Zampronio, A.R., de Assis, H.C. 2014. Effects of anti-inflammatory drugs in primary kidney cell culture of a freshwater fish. *Fish & Shellfish Immunology* 40, 296-303.
- Rocco, L., Frenzilli, G., Fusco, D., Peluso, C., Stingo, V. 2011. Evaluation of zebrafish DNA integrity after exposure to pharmacological agents present in aquatic environments. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73, 1530-1536.
- Ruas, C.B.G., Carvalho, C.S., Araújo, H.S.S., Espíndola, E.L.G., Fernandes, M.N. 2008. Oxidative stress biomarkers of exposure in the blood of cichlid species from a metal-contaminated river. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 71, 86–93.
- Santos-Silva, T.G., Montagner, C.C., Martinez, C.B.R. 2018. Evaluation of caffeine effects on biochemical and genotoxic biomarkers in the neotropical freshwater teleost *Prochilodus lineatus*. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 58, 237-242.
- Sathishkumar, P., Meena, R.A.A., Palanisami, T., Ashokkumar, V., Palvannan, T., Gua, F.L. 2019. Occurrence, interactive effects and ecological risk of diclofenac in environmental compartments and biota - a review. *Science of the Total Environment* 698, 134057.
- Schwaiger, J., Ferling, H., Mallowa, U., Wintermayr, H., Negele, R.D. 2004. Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac Part I: histopathological alterations and bioaccumulation in rainbow trout. *Aquatic Toxicology* 68, 141–150.
- Shi, C., He, Y., Liu, J., Lu, Y., Fan, Y., Liang, Y., Xu, Y. 2019. Ecotoxicological effect of single and combined exposure of carbamazepine and cadmium on female *Danio rerio*: a multibiomarker study. *Applied Science* 9, 1362.
- Shihomatsu, H.M., Martins, E.A.J., Cotrim, M.E.B., Lebre, D.T., Ortiz, N., Pires, M.A.F. 2017. Guarapiranga Reservoir-Pharmaceuticals and historical urban occupation in a water source. *Journal of Geoscience and Environmental Protection* 5, 1-17.

- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L.A. 1988. Single technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research* 175, 184–191.
- Starling, M.C.V.M., Amorim, C.C., Leão, M.M.D. 2019. Occurrence, control and fate of contaminants of emerging concern in environmental compartments in Brazil. *Journal of Hazardous Materials* 372, 17-36.
- Stepanova, S., Praskova, E., Chromcova, L., Plhalova, L., Prokes, M., Blahova, J., Svobodova, Z. 2013. The effects of diclofenac on early life stages of common carp (*Cyprinus carpio*). *Environmental Toxicology and Pharmacology* 35, 454-460.
- Storey, K.B. 1996. Oxidative Stress: animal adaptations in nature. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 29, 1715-1733.
- Tincani, F.H., Santos, G.S., Azevedo, A.C.B., Marques, A.E.M.L., Pereira, L.S., Castellano, G.C., Silva, T.A., Galvan, G.L., Chimentão, F.G., Silva, C.P., Ribeiro, C.A.O., de Assis, H.C.S., Campos, S.X., Ramsdorf, W.A., Cestari, M.M. 2019. Climbing the taxonomic ladder: Could a genus be used as bioindicator? The ecotoxicological relationship between biomarkers of *Astyanax altiparanae*, *Astyanax bifasciatus* and *Astyanax ribeirae*. *Ecological Indicators* 106, 105474.
- WHO. 2011. Public Health and Environment Water, Sanitation, Hygiene and Health. Pharmaceuticals in Drinking-water. World Health Organization. 35 p.
- Willson, C. 2018. The clinical toxicology of caffeine: A review and case study. *Toxicology Reports* 5, 1140-1152.
- Zheng, X., Dai, W., Chen, X., Wang, K., Zhang, W., Liu, I., Hou, J. 2015. Caffeine reduces hepatic lipid accumulation through regulation of lipogenesis and ER stress in zebrafish larvae. *Journal of Biochemical Science* 22, 105.

## CAPÍTULO 3

### **Alterações bioquímicas e genotóxicas em *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae) em reservatórios poluídos**

Marcela Muñoz-Peñuela<sup>a\*</sup>, Fabiana Laura Lo Nostro<sup>b</sup>, Aline Dal'Olio Gomes<sup>a</sup>, Carlos Eduardo Tolussi<sup>c</sup>, Renata Guimarães Moreira<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Fisiologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. Rua do Matão, Trav.14, n° 321, 05508-090 São Paulo, SP, Brazil

<sup>b</sup> Laboratorio de Ecotoxicología Acuática, Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires & IBBEA, CONICET-UBA. Ciudad Universitaria (C1428EHA), Buenos Aires, Argentina

<sup>c</sup> Universidade Anhembi-Morumbi, Campus Mooca, São Paulo SP, Brazil

\*marce8407@gmail.com

#### **Abstract**

Economic and population growth also brought an increase in the demand for water, thus generating the construction of dams. However, these social and industrial activities have contributed to the deterioration of water quality in these environments. The Billings and Guarapiranga urban reservoirs, two of the main ones for water supply and electricity production in the Metropolitan Region of São Paulo, are under high anthropic impact. Based on the above, the aim of the present study was to investigate biomarkers of oxidative stress (as early warning indicators) and damage to macromolecules (to assess health status) in adult females of *Astyanax altiparanae* present in different branches of both reservoirs (Guarapiranga: Embu-Guaçu, Barragem and Aracati; Billings: Bororé and Pedreira), which present different degrees of pollution, in two seasons, winter and summer. Physical and chemical variables in water (FC) were characterized, together with biomarkers of oxidative stress in the gills and liver (superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), catalase (CAT), glutathione S-transferase (GST) and lipoperoxidation (LPO)), and blood genotoxicity biomarkers, using the comet, micronucleus (MN) and nuclear

abnormalities (NA) test. The results of the FC analyses in the water showed the great anthropic impact to which both reservoirs are subjected, due to the high concentrations of nutrients and chlorophyll-a, in addition to metals and drugs, variables that were higher in the Aracati point in Guarapiranga and Pedreira at Billings. In general, a greater activity of antioxidant enzymes was observed both in the gills and in the liver of fish collected during the winter in all environments; however, only differences in the levels of hepatic LPO were observed, both in winter and in summer, making evident the difference in responses according to the evaluated tissue. The responses of the genotoxicity biomarkers also showed greater damage in winter compared to summer. In general, the animals in Billings, mainly in Pedreira, are subject to a greater stress load than in Guarapiranga. It was possible to verify a seasonal influence on the physiological responses, suggesting that the fish are under greater environmental stress during the winter compared to summer.

**Keywords:** chronic toxicity, genotoxicity, oxidative stress, seasonality,

## **Resumo**

O crescimento econômico e populacional trouxe consigo um aumento na demanda por água, gerando assim a construção de barragens. No entanto, essas atividades sociais e industriais têm contribuído para a deterioração da qualidade da água desses ambientes. Os reservatórios urbanos Billings e Guarapiranga, dois dentre os principais para abastecimento de água e produção de energia elétrica da Região Metropolitana de São Paulo (RMSP), se encontram sob alto impacto antrópico. Com base no exposto, o objetivo do presente estudo foi investigar biomarcadores de estresse oxidativo (como indicadores de alerta precoce) e de danos às macromoléculas (para avaliar o estado de saúde) em fêmeas adultas de *Astyanax altiparanae* presentes em diferentes braços de ambos os reservatórios (Guarapiranga: Embu-Guaçu, Barragem e Aracati; Billings: Bororé e Pedreira), que apresentam diferentes graus de poluição, em duas estações do ano, inverno e verão. Foram avaliadas variáveis físicas e químicas na água (FQ), analisados

biomarcadores de estresse oxidativo nas brânquias e fígado (superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), catalase (CAT), glutathione S-transferase (GST) e lipoperoxidação (LPO)), e biomarcadores de genotoxicidade no sangue, utilizando o teste de cometa, micronúcleo (MN) e anormalidades nucleares (AN). Os resultados das análises FQ na água mostraram o grande impacto antrópico ao qual ambos os reservatórios estão submetidos, devido às altas concentrações de nutrientes e clorofila-a, além de metais e fármacos encontrados, sendo estas variáveis mais elevadas nos pontos Aracati na Guarapiranga e Pedreira na Billings. Em geral foi observada maior atividade das enzimas antioxidantes tanto nas brânquias como no fígado dos peixes coletados durante o inverno em todos os ambientes; porém só foram observadas diferenças nos níveis de LPO no fígado, tanto no inverno como no verão, deixando evidente a diferença nas respostas de acordo com o tecido avaliado. As respostas dos biomarcadores de genotoxicidade também mostraram um maior dano no inverno comparado ao verão. Em geral, os animais na Billings, principalmente na Pedreira, estão sujeitos a uma maior carga estressora do que na Guarapiranga. Foi possível verificar uma influência sazonal nas respostas fisiológicas, sugerindo que os peixes estão sob maior estresse ambiental durante o inverno em comparação ao verão.

**Palavras-chave:** estresse oxidativo, genotoxicidade, sazonalidade, toxicidade crônica

### **Highlights**

- \* As fêmeas de *A. altiparanae* apresentaram maior estresse oxidativo no inverno do que no verão.
- \* As fêmeas de *A. altiparanae* apresentaram maior genotoxicidade no inverno do que no verão.
- \* O fígado é mais sensível para as respostas de estresse oxidativo do que as brânquias.
- \* Os peixes da Billings evidenciaram maiores alterações do que os peixes da Guarapiranga.

## 1. Introdução

O crescimento econômico e populacional trouxe consigo um aumento na demanda por água, gerando assim a construção de barragens que ajudam a suprir as necessidades de água e energia elétrica para o desenvolvimento industrial, agrícola e urbano (Mariani et al., 2006; López-Doval et al., 2016; Lennox et al., 2018). No entanto, essas atividades sociais e industriais contribuem para a deterioração da qualidade da água, uma vez que as barragens também servem como receptores de esgotos domésticos e industriais (Mariani et al., 2006; López-Doval et al., 2017), que em poucos casos possuem tratamentos adequados para eliminar substâncias tóxicas (Shihomatsu et al., 2017).

A Região Metropolitana de São Paulo (RMSP) é um dos maiores complexos urbanos e industriais da América do Sul, que integra 39 municípios e cerca de 20 milhões de habitantes (López-Doval et al., 2016; Bógus e Pasternak, 2019). A RMSP conta com várias barragens, sendo os reservatórios Guarapiranga e Billings dois dos principais utilizados para abastecimento de água e produção de energia elétrica (Cardoso-Silva et al., 2014; Shihomatsu et al., 2017). Ambos os reservatórios fazem parte da bacia do Alto Tietê e são impactados pelo desmatamento, erosão do solo, atividades agrícolas e industriais e assentamentos regulares e irregulares (Almeida e Weber, 2005; López-Doval et al., 2017). Portanto, a qualidade da água desses reservatórios tem sido afetada por um grande número de poluentes, incluindo substâncias como pesticidas (carbendazim, fipronil, tebuconazol), compostos farmacológicos (acetaminofeno, atenolol, cafeína, diclofenaco, ibuprofeno), hormônios ( $17\alpha$ -etinilestradiol,  $17\beta$ -estradiol), drogas ilícitas (benzoilecgonina, cocaína) e plastificantes (bisfenol A, dibutilftalato), entre outros (Almeida e Weber, 2005; López-Doval et al., 2017; Shihomatsu et al., 2017; Montagner et al., 2019).

Geralmente, os órgãos ambientais fazem uso da medição de variáveis físicas e químicas para monitorar a qualidade da água, no entanto, estas fornecem apenas informações pontuais do momento da coleta. Portanto, em estudos mais amplos nos quais se pretende obter informações sobre a qualidade de água em um período

mais longo, são utilizados índices de diversidade, onde a abundância e a distribuição de organismos aquáticos são consideradas indicadores da qualidade da água (Mariani et al., 2006; Francisco et al., 2019). Adicionalmente, a presença, ausência ou abundância de uma população são geralmente indicadores tardios do estado de um corpo de água; assim, por várias décadas, os ecotoxicologistas vêm usando biomarcadores fisiológicos como sinais precoces de presença de contaminantes (Hoymack, 2010; Hook et al., 2014; Colin et al., 2016; Lennox et al., 2018). Muitos desses compostos xenobióticos são geralmente encontrados em baixas concentrações ( $\text{ng L}^{-1}$  a  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), que avaliados de uma perspectiva maior, não representariam risco; no entanto, assumindo a exposição crônica, eles podem ter efeitos significativos na saúde dos organismos aquáticos (Colin et al., 2016).

Os biomarcadores são respostas mensuráveis nos níveis molecular, celular, histológico, fisiológico ou comportamental a um ou mais estressores (Colin et al., 2016). Um dos maiores dilemas na realização de um estudo ecotoxicológico é a seleção de biomarcadores que sejam sensíveis e ecologicamente relevantes, de forma que o conhecimento mecanicista da fisiologia do organismo possa estar relacionado aos efeitos, no nível da população (Hook et al., 2014; Colin et al., 2016).

Os seres vivos têm mecanismos de resposta e defesa que lhes permitem sobreviver em ambientes degradados. Dentre estes destaca-se uma série de enzimas, metabólitos e vias de biotransformação de compostos xenobióticos, os quais geralmente são rapidamente induzidos após serem expostos a um ou mais estressores, sendo as respostas relacionadas a estes mecanismos amplamente utilizadas como sinais precoces de deterioração da saúde dos organismos (Amiard-Triquet et al., 2013; Hook et al., 2014; Colin et al., 2016).

Dentre os biomarcadores mais amplamente utilizados em ambientes naturais, estão os relacionados ao estresse oxidativo (enzimas antioxidantes e biomoléculas), principalmente porque, quando os organismos são expostos a diferentes estressores, é desencadeada uma maior produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), podendo induzir ou inibir o sistema de defesa antioxidante (Livingstone, 2001; Amiard-Triquet et al., 2013; Lennox et al., 2018). No primeiro caso, pode-se observar que o organismo está enfrentando alterações ambientais,



enquanto no segundo, os danos são evidenciados pela toxicidade dos poluentes (Amiard-Triquet et al., 2013). Portanto, biomarcadores que mostram danos quando o sistema de defesa não é suficiente para combater os compostos xenobióticos também são utilizados, incluindo a oxidação de moléculas como lipídios, proteínas e DNA (ácido desoxirribonucleico) (Livingstone, 2001; Amiard-Triquet et al., 2013; Colin et al., 2016).

Atualmente, existem poucos estudos avaliando respostas fisiológicas em organismos aquáticos presentes nos reservatórios Guarapiranga e Billings. Dentre estes, destacam-se dois estudos relacionando o perfil de ácidos graxos de peixes ao grau de trofia dos corpos d'água (Gomes et al., 2016; Marques et al., 2020), e outros dois relacionados ao efeito dos poluentes presentes nestes reservatórios, às variáveis fisiológicas reprodutivas (Tolussi et al., 2018; Gomes et al., 2015). Sendo assim, existem poucas informações sobre o processo de desintoxicação ou do sistema de defesa antioxidante relacionadas ao nível de contaminação desses corpos d'água. Rocha-e-Silva et al. (2004) avaliaram a atividade de enzimas hepáticas envolvidas no processo de desintoxicação de compostos xenobióticos em tilápias (*Oreochromis niloticus*) no reservatório Guarapiranga, próximo ao ponto de bombeamento de água da Billings, relatando que a atividade é menor após o bombeamento provavelmente devido à diluição dos contaminantes. Bainy et al. (1996), observaram que tilápias da Billings apresentaram estresse oxidativo nos eritrócitos, brânquias, fígado e rim.

Estes estudos realizados na Billings utilizaram como modelo uma espécie de teleósteo exótica, sendo escassas as informações sobre espécies nativas. Com base no exposto, no presente estudo foi utilizada uma espécie nativa: o lambari-do-rabo-amarelo *Astyanax altiparanae* como modelo. Essa espécie foi selecionada como modelo devido à sua abundância e ampla distribuição nos locais de estudo, além de apresentar importância econômica, por ser utilizada na pesca esportiva para consumo humano (Bertolucci et al., 2008), além de sua importância ecológica na cadeia alimentar (Marceniuk e Hilsdorf, 2010). Adicionalmente, esta espécie tem sido relatada como uma espécie sensível para monitorar a qualidade de corpos d'água (Vieira et al., 2017; Calado et al., 2019; Francisco et al., 2019; Marques et

al., 2020). O objetivo do presente estudo foi investigar biomarcadores de estresse oxidativo (como indicadores de alerta precoce) e de danos às macromoléculas (para avaliar o estado de saúde) em fêmeas adultas de *A. altiparanae* em diferentes braços dos reservatórios mencionados acima, que apresentam diferentes graus de poluição, em duas estações do ano, inverno e verão.

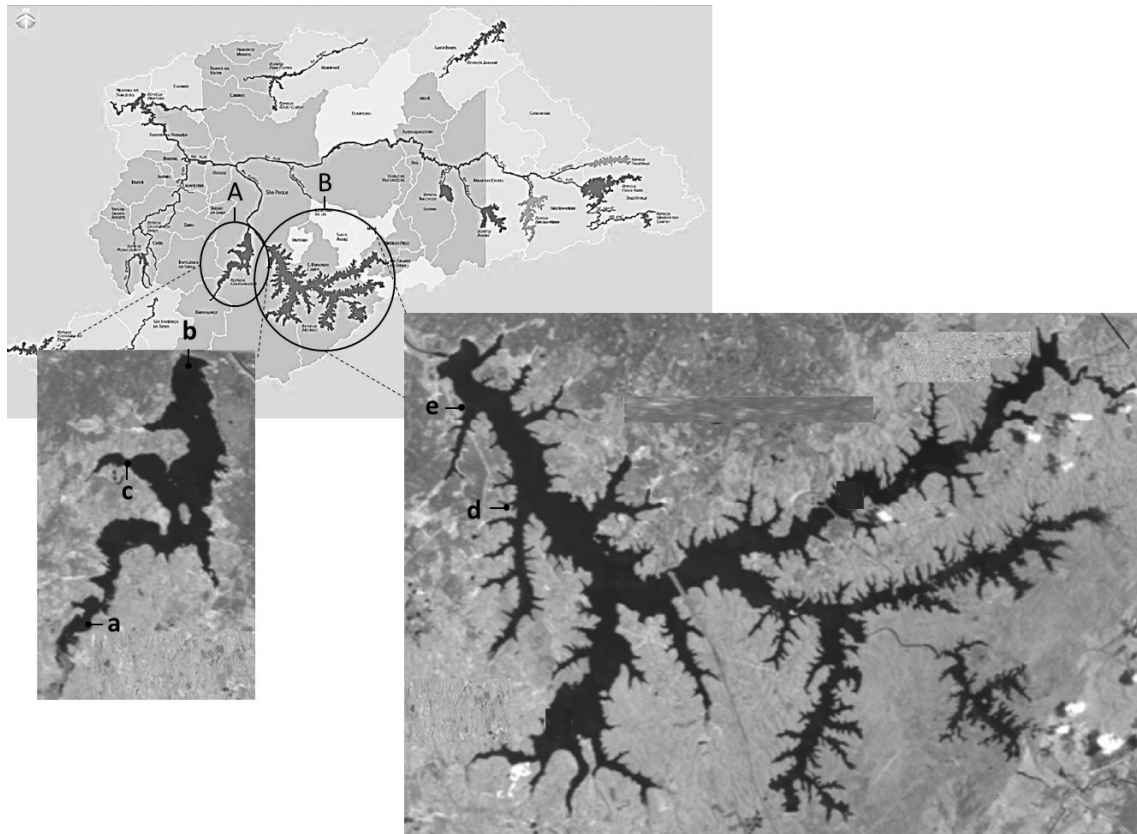
## **2. Material e Métodos**

### **2.1. Locais de estudo**

Os ambientes de estudo, reservatórios Guarapiranga (Figura 1A) e Billings (Figura 1B), estão localizados na RMSP e fazem parte da Bacia Hidrográfica do Alto Rio Tietê (Fontana et al., 2014). O reservatório Guarapiranga é utilizado para fornecer água para quase 2 milhões de pessoas da RMSP (Fontana et al., 2014), e é constantemente impactado por desmatamento, erosão e ocupação irregular do solo, sendo a agricultura, presença de áreas urbanas e industriais, além de efluentes domésticos e industriais não tratados, as principais fontes de poluição (Shihomatsu et al., 2017). Neste reservatório, três pontos de amostragem foram selecionados: próximo ao tributário Embu-Guaçu (Figura 1a), região considerada menos poluída, porém com presença de atividades agrícolas; no braço denominado Barragem (Figura 1b) que está densamente ocupado por favelas, residências e iate clubes; e o braço Aracati (Figura 1c) caracterizado por uma intensa ocupação irregular.

O reservatório Billings é utilizado para a geração de energia elétrica (EMAE, 2002), e tem sido caracterizado por uma intensa ação antrópica, como lançamentos de esgotos domésticos e efluentes industriais, desmatamento, além da grande ocupação desordenada do solo (Cardoso-Silva et al., 2014). Neste reservatório as coletas foram realizadas no braço Bororé (Figura 1d), que está sob influência das águas do braço Pedreira, além de grande ocupação urbana com baixa cobertura sanitária; e braço Pedreira (Figura 1e) diretamente impactado pelo bombeamento

do rio Pinheiros, que recebe grande quantidade de esgoto doméstico e industrial da Grande São Paulo (Almeida e Weber, 2005).



**Figura 1:** Mapa da bacia do Rio Tietê indicando os reservatórios A) Guarapiranga: a-Embu-Guaçu, b-Barragem, c-Aracati. B) Billings: d-Bororé, e-Pedreira. (Modificado de: FABHAT, 2016).

## 2.2. Coleta e análises de água

As amostras de água foram coletadas no centro dos locais previamente determinados em dois períodos: inverno (julho-agosto/2017) considerada época seca, e verão (janeiro-fevereiro/2018) considerada época de chuvas, concomitantemente com a captura dos animais

Inicialmente foi registrado *in situ* a concentração de oxigênio dissolvido ( $\text{mg L}^{-1}$ ), o pH e a temperatura da água ( $^{\circ}\text{C}$ ) utilizando uma sonda multiparâmetros portátil (YSI Professional Plus). Posteriormente, foram coletadas amostras de água em três profundidades diferentes da coluna d'água (superfície, meio e fundo)

usando uma garrafa de Van Dorn com capacidade de 5 litros, sendo as amostras imediatamente acondicionadas em um recipiente para mistura das três camadas. Desta mistura foram separadas amostras em três recipientes para diferentes análises: 1) nutrientes e metais totais: garrafas plásticas de 250 mL (previamente acidificadas com 250 µL de ácido nítrico); 2) nutrientes dissolvidos e clorofila-a: amostras de água filtrada com filtros Whatman GF/C em garrafas plásticas de 500 mL; 3) concentração de fármacos: garrafas de vidro âmbar de 250 mL. Todas estas amostras foram mantidas em gelo até o transporte ao laboratório, onde foram armazenadas na geladeira até seu respectivo processamento.

### 2.2.1. Análises de nutrientes e clorofila-a

As concentrações dos nutrientes totais, dissolvidos, sólidos em suspensão e clorofila-a foram analisadas no laboratório de Limnologia do Departamento de Ecologia do Instituto de Biociências da USP. Na Tabela 1 se encontram os protocolos para cada análise.

**Tabela 1:** Protocolos utilizados para análise das variáveis físicas e químicas da água nos diferentes pontos dos reservatórios Guarapiranga e Billings.

| Variável        | Limite de detecção do método | Unidade            | Método              | Referência             |
|-----------------|------------------------------|--------------------|---------------------|------------------------|
| ST              | --                           | mg L <sup>-1</sup> | Gravimétrico        | Wetzel e Likens (1991) |
| NO <sub>2</sub> | < 8,0                        | µg L <sup>-1</sup> | Espectrofotométrico | Mackereth (1978)       |
| NO <sub>3</sub> | < 5,0                        | µg L <sup>-1</sup> | Espectrofotométrico | Mackereth (1978)       |
| NH <sub>4</sub> | < 4,2                        | µg L <sup>-1</sup> | Espectrofotométrico | Koroleff (1976)        |
| NT              | < 5,0                        | µg L <sup>-1</sup> | Espectrofotométrico | Valderrama (1981)      |
| FT              | < 10,0                       | µg L <sup>-1</sup> | Espectrofotométrico | Valderrama (1981)      |
| Chl-a           | --                           | µg L <sup>-1</sup> | Espectrofotométrico | Wetzel e Likens (1991) |

ST: sólidos totais; NO<sub>2</sub>: nitritos; NO<sub>3</sub>: nitratos; NH<sub>4</sub>: amônia; NT: nitrogênio total; FT: fósforo total; Chl a: clorofila a

O Índice do Estado Trófico (IET) foi calculado de acordo com a equação de Lamparelli (2004):

$$\text{IET (Chl-a)} = 10 \times (6 - ((0,92 \times 0,34 \times (\ln \text{CL})) / \ln 2))$$

$$\text{IET (FT)} = 10 \times (6 - ((1,77 - 0,42 \times (\ln \text{FT})) / \ln 2))$$

onde:

Chl-a: concentração de clorofila-a medida à superfície da água em  $\mu\text{g L}^{-1}$

FT: concentração de fósforo total medido à superfície da água em  $\mu\text{g L}^{-1}$

ln: logaritmo natural

Os limites foram definidos de acordo com a ponderação entre as duas fórmulas e o grau de trofia foi definido segundo o valor do IET: ultraoligotrófico ( $\leq 47$ ), oligotrófico (47 – 52), mesotrófico (52 - 59), eutrófico (59 - 63), supereutrófico (63 - 67), hipereutrófico ( $> 67$ ).

### 2.2.2. Análises de fármacos

Para as análises de fármacos, as amostras de água foram filtradas com filtros Whatman de 45  $\mu\text{m}$  acoplados em uma seringa e armazenadas em frascos âmbar a 10 °C. A concentração foi medida pelo método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (Agilent Technologies, USA) acoplada a um analisador de Espectrometria de Massas do tipo Triplo Quadrupolo (EM/EM) (ABSciex). As análises foram terceirizadas no Centro de Espectrometria de Massas Aplicada do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares da USP. Foram analisados dois dos fármacos mais encontrados nos corpos de águas naturais do estado de São Paulo, diclofenaco e cafeína (Almeida e Weber, 2005; López-Doval et al., 2017; Shihomatsu et al., 2017). O detalhamento assim como os laudos das análises encontram-se nos anexos 5 e 6.

### 2.2.3. Análises de metais

A análise da concentração de metais totais na água foi realizada no laboratório de Limnologia do IB/USP. As amostras de água foram digeridas (100 mL) com adição de 5 mL de ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ , Merck) a uma temperatura de 90 °C até o volume ser reduzido para cerca de 20 mL. Em seguida, as amostras foram filtradas com filtros Whatman de 45  $\mu\text{m}$  e armazenadas a 4 °C até a leitura (Método

3005 A-EPA) (APHA, 1998), que foi realizada por espectroscopia de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES), usando um instrumento Agilent Modelo 720.

### 2.3. Captura dos animais e coleta de amostras biológicas

No presente estudo foram utilizadas fêmeas adultas de *Astyanax altiparanae*. Os peixes, de grande ocorrência nos reservatórios de estudo, foram capturados nos trechos previamente determinados utilizando-se rede de espera, que foram mantidas durante 12 h e revisadas cada 3 h. Uma vez capturados, os animais foram mantidos em tanques de 200 L com aeração constante até o momento da coleta de tecidos. Os animais foram anestesiados com 0,1% de benzocaína e imediatamente coletada uma amostra de sangue através da punção da vasculatura caudal. 10 µL de sangue foram adicionados a 1 mL de tampão de criopreservação e armazenados em nitrogênio líquido até o processamento do teste cometa (período máximo de um mês) (Jackson et al., 2013). Outros 10 µL de sangue foram usados em esfregaço de sangue sobre lâminas para microscopia (2 lâminas por peixe, cada uma com 5 µL de sangue) para as análises de micronúcleo (MN) e anormalidades nucleares (AN). Estas lâminas permaneceram secando durante 24 h e em seguida fixadas com metanol absoluto durante 10 minutos. Após a coleta de sangue, os animais foram eutanasiados por secção da medula espinhal na altura do opérculo, conforme aprovação do Comitê de Ética Animal da Universidade de São Paulo (Protocolo 275/2017). Finalmente, foram coletadas amostras de filamentos das brânquias e fígado, que foram mantidas em ultrafreezer -80 °C até o processamento.

### 2.4. Análises de enzimas antioxidantes

Amostras de brânquias e fígado foram previamente pesadas e homogeneizadas em tampão fosfato de potássio (0,1 M; pH 7.0; 1:10 w.v<sup>-1</sup> para fígado e 1:5 w.v<sup>-1</sup> para brânquias) e centrifugadas a 15000 x g durante 20 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi separado para as análises de atividade das enzimas

superoxidodismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), catalase (CAT) e glutathione S-transferase (GST).

A atividade da SOD foi analisada seguindo o método descrito por McCord e Fridovich (1969), lendo a cinética em espectrofotômetro a 550 nm (25 °C), acompanhando a inibição da taxa de medida da inibição do citocromo C pelo radical superóxido. A GPx foi analisada seguindo o método descrito por Hopkins e Tudhope (1973), estimando a atividade desta enzima através da oxidação da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, usando o espectrofotômetro em 340 nm (25 °C). A atividade da CAT foi quantificada por meio da velocidade de decomposição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pela enzima de acordo com o método descrito por Beutler et al. (1975), com leitura no espectrofotômetro a 240 nm (25 °C). A atividade da GST foi quantificada no espectrofotômetro a 340 nm (25 °C) seguindo o método de Habig et al. (1974), medindo a conjugação de GSH com 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB).

A concentração total de proteínas, em todos os tecidos, foi calculada para normalizar as enzimas analisadas usando o método colorimétrico de Lowry et al. (1951), utilizando albumina de soro bovino como padrão e leitura no espectrofotômetro a 660 nm. As análises de atividades das enzimas, assim como a concentração de proteínas foram realizadas em um espectrofotômetro de microplacas (SpectraMax 190, Molecular Devices).

## 2.5. Análises de lipoperoxidação

A ocorrência de lipoperoxidação (LPO) foi analisada nas brânquias e no fígado, utilizando-se o método de FOX (método de oxidação ferrosa/laranja de xylenol) adaptado por Hermes-Lima et al. (1995). As medições de LPO foram realizadas em um leitor de microplacas (SpectraMax 190, Molecular Devices).

## 2.6. Análises de genotoxicidade

Para a análise do teste cometa, a amostra de sangue armazenada no tampão de criopreservação foi inicialmente descongelada, mas mantida refrigerada em gelo. O teste foi realizado seguindo o método descrito por Singh et al. (1988). Foram adicionados 10 µL de sangue a 120 µL de agarose de baixo ponto de fusão para homogeneização. Posteriormente, três gotas do homogeneizado foram espalhadas em uma lâmina, que foi coberta com uma lamínula (duas lâminas por peixe) e mantidas na geladeira a 4 °C durante 50 minutos. Após este período, as lamínulas foram cuidadosamente retiradas e as lâminas foram submetidas aos seguintes processos: 1) lise por 1 h a 4 °C protegida da luz; 2) denaturação do DNA por 30 min imersas em tampão de eletroforese no escuro; 3) eletroforese por 20 minutos a 300 mA e a 1 V por centímetro de comprimento da cuba utilizada; 4) três lavagens com solução de neutralização. Finalmente, as lâminas foram fixadas após a secagem em etanol absoluto por 10 minutos.

A contagem e classificação das células foi realizada utilizando o *GelRed* como corante e um microscópio de fluorescência (Leica DMI8) com um aumento de 400x. No total foram contadas 100 células por lâmina e a classificação foi realizada segundo Collins et al. (2008): classe 0= sem dano aparente, classe 1= comprimento da cauda menor do que o diâmetro do nucleóide, classe 2= comprimento da cauda igual ao diâmetro do nucleóide, classe 3= comprimento da cauda maior do que o diâmetro do nucleóide. Os scores de cada grupo experimental foram calculados multiplicando o número dos nucleóides visualizados em cada classe pelo valor da classe (0, 1, 2 ou 3).

O teste de MN foi realizado de acordo com o método descrito por Al-Sabti e Metcalfe (1995) e o teste de AN segundo Carrasco et al. (1990). As lâminas já fixadas em metanol absoluto foram coradas com Giemsa (10%) e para cada lâmina foram examinados 1000 eritrócitos usando um microscópio de luz (Leica DM1000) com um aumento de 1000x.



## 2.7. Análises estatísticas

Para avaliar as diferenças das respostas fisiológicas entre os tratamentos foi utilizado o teste de Análise de Variância *two-way* ANOVA, seguido do teste de Holm-Sidak como prova Post Hoc. A normalidade foi avaliada através do teste de Shapiro-Wilks e a homogeneidade de variância através do teste de Bartlett. O software utilizado foi o SIGMASTAT para Windows Ver. 3.10 (Systats Software Inc., San Jose, CA, EUA). Em todos os casos foi considerado um nível de significância de  $p < 0,05$  como estatisticamente significativo.

## 3. Resultados

### 3.1. Caracterização física e química da água

A descrição dos resultados físicos e químicos da água são qualitativos, pois foi realizada apenas uma medição para caracterização da água, motivo pelo qual não foi realizada a análise estatística dos dados. A temperatura nos reservatórios evidenciou uma variação temporal junto com a concentração de oxigênio dissolvido, de modo que no inverno, quando a temperatura foi mais baixa, os valores de oxigênio dissolvido foram maiores, com exceção de Aracati, e no verão quando a temperatura da água foi mais alta, foram observados menores valores de oxigênio dissolvido (Tabela 2). O pH apresentou pequenas variações ao longo do ano, observando-se valores na faixa da neutralidade na maioria dos ambientes, com exceção da Pedreira onde encontrou-se pH básico (Tabela 2).

Em geral, no inverno foram registrados os maiores valores de nutrientes (compostos nitrogenados e fósforo), principalmente nos pontos de Aracati e Pedreira; enquanto no verão, os valores mais altos foram obtidos no ponto de Pedreira (Tabela 2). De acordo com os valores do IET, os pontos Barragem e Aracati do reservatório Guarapiranga podem ser classificados como supereutróficos nas duas estações; enquanto o grau de trofia de Embu-Guaçu e Bororé apresentou uma melhora entre o inverno e o verão, de eutrófico a mesotrófico e de supereutrófico a

eutrófico, respectivamente. Em Pedreira a situação foi inversa, sendo classificado como supereutrófico no inverno e hipereutrófico no verão (Tabela 2).

Com relação aos fármacos analisados, a concentração de diclofenaco na água se encontrou abaixo do limite de detecção em todos os pontos, com exceção no ponto Aracati no inverno, onde também foi observada alta concentração de cafeína (Tabela 2). A concentração de cafeína foi similar em todos os pontos de amostragem no verão, em comparação ao inverno, quando foram observadas grandes variações nos valores entre os locais (Tabela 2).

Finalmente, considerando-se os metais, o alumínio, o bário e o estrôncio estiveram presentes em altas concentrações em todos os pontos de coleta nas duas estações; o cobre e o manganês também estiveram presentes em altas concentrações, principalmente no inverno, nos pontos Barragem e Aracati do reservatório Guarapiranga (Tabela 2). Altas concentrações de zinco foram também encontrados na água principalmente nos pontos Embu-Guaçu e Bororé na coleta de verão (Tabela 2).

**Tabela 2:** Variáveis físicas e químicas da água dos pontos de coleta nos reservatórios da Guarapiranga e Billings no inverno/2017 e verão/2018.

| Variável                              | Inverno      |       |        |          |        | Verão        |       |       |          |       |
|---------------------------------------|--------------|-------|--------|----------|--------|--------------|-------|-------|----------|-------|
|                                       | Guarapiranga |       |        | Billings |        | Guarapiranga |       |       | Billings |       |
|                                       | EG           | Ba    | Ar     | Bo       | Pe     | EG           | Ba    | Ar    | Bo       | Pe    |
| T (°C)                                | 16,2         | 16,7  | 16,4   | 17,5     | 17,5   | 21,5         | 24    | 22,8  | 24       | 24,6  |
| OD (mg L <sup>-1</sup> )              | 6,5          | 7,1   | 2,9    | 7,8      | 9,5    | 3,9          | 5,4   | 5     | 4,9      | 5,8   |
| pH                                    | 7,7          | 7,7   | 7,9    | 8,3      | -      | 6,4          | 7,4   | 8,3   | 8,6      | 9     |
| ST (mg L <sup>-1</sup> )              | 4            | 6,4   | 7,2    | 18       | 9,6    | 5,6          | 4,8   | 9,2   | 9,2      | 56,8  |
| NO <sub>2</sub> (µg L <sup>-1</sup> ) | 5,1          | 113,5 | 85,7   | 124,6    | 342,8  | 2,8          | 7,4   | 14,0  | 5,7      | 12,7  |
| NO <sub>3</sub> (µg L <sup>-1</sup> ) | 83,7         | 623,2 | 270,0  | 431,0    | 855,2  | 72,4         | 490,2 | 171,9 | 408,0    | 359,1 |
| NH <sub>4</sub> (µg L <sup>-1</sup> ) | < LD         | < LD  | 1447,2 | 63,2     | 813,0  | 36,5         | < LD  | 376,4 | < LD     | < LD  |
| NDT (µg L <sup>-1</sup> )             | 88,8         | 736,7 | 1802,9 | 618,8    | 2011,0 | 111,7        | 497,6 | 562,3 | 413,7    | 371,8 |
| NT (µg L <sup>-1</sup> )              | 530,9        | 429,6 | 2553,9 | 579,2    | 734,0  | 433,4        | 236,9 | 682,0 | 303,9    | 755,0 |
| FT (µg L <sup>-1</sup> )              | 9,7          | 52,3  | 107,9  | 166,3    | 120,7  | 8,6          | 17,5  | 19,8  | 16,9     | 113,5 |
| Chl a                                 | 5,3          | 42,4  | 41,2   | 143,5    | 40,1   | < LD         | 37,4  | 43,8  | 5,3      | 327,0 |
| IET                                   | 60,1         | 63,4  | 66,7   | 65,4     | 66,6   | 52,2         | 64,1  | 64,9  | 59,2     | 75,1  |
| IET                                   | E            | S     | S      | S        | S      | M            | S     | S     | E        | H     |

|                           |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
|---------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| DCF (ng L <sup>-1</sup> ) | < LD   | < LD   | 11,2   | < LD   | < LD   | < LD   | < LD   | < LD   | < LD   | < LD   |
| CAF (ng L <sup>-1</sup> ) | 118,5  | 178,5  | 1580,0 | 23,0   | < LD   | 132,0  | 285,0  | 224,0  | 183,0  | 172,0  |
| Al (µg L <sup>-1</sup> )  | 482,55 | 124,88 | 310,83 | 194,03 | 169,63 | 757,73 | 194,33 | 126,01 | 160,80 | 290,50 |
| Ag (µg L <sup>-1</sup> )  | 1,49   | 1,35   | 0,99   | 1,79   | 3,39   | 0,03   | < LD   | 1,24   | 0,24   | 1,49   |
| Ba (µg L <sup>-1</sup> )  | 19,00  | 41,93  | 57,90  | 35,78  | 37,30  | 22,32  | 31,30  | 33,68  | 33,47  | 34,26  |
| Cd (µg L <sup>-1</sup> )  | < LD   | < LD   | < LD   | < LD   | < LD   | 5,54   | 0,94   | 1,11   | 1,00   | 1,75   |
| Cr (µg L <sup>-1</sup> )  | 8,63   | 3,57   | 5,27   | 7,07   | 5,63   | < LD   | < LD   | < LD   | < LD   | < LD   |
| Co (µg L <sup>-1</sup> )  | 2,89   | 0,82   | < LD   | 0,80   | < LD   | 1,04   | < LD   | 0,31   | < LD   | < LD   |
| Cu (µg L <sup>-1</sup> )  | 7,35   | 109,89 | 60,15  | 8,19   | 11,09  | 1,57   | 61,74  | 26,56  | < LD   | < LD   |
| Mn (µg L <sup>-1</sup> )  | 47,13  | 148,01 | 269,78 | 89,74  | 131,20 | 86,31  | 97,20  | 93,27  | 88,43  | 74,85  |
| Ni (µg L <sup>-1</sup> )  | 14,80  | 16,20  | 7,96   | 4,49   | 10,87  | < LD   | < LD   | < LD   | < LD   | < LD   |
| Pb (µg L <sup>-1</sup> )  | 7,51   | < LD   | < LD   | 3,64   | < LD   | 15,27  | 11,22  | 3,28   | 0,01   | 0,43   |
| Sr (µg L <sup>-1</sup> )  | 34,55  | 91,11  | 100,39 | 121,58 | 132,83 | 35,96  | 91,18  | 82,21  | 119,94 | 120,65 |
| Zn (µg L <sup>-1</sup> )  | 46,32  | 51,76  | 34,27  | 40,35  | 66,12  | 126,33 | 76,12  | 94,10  | 204,24 | 31,93  |

EG: Embu-Guaçu; Ba: Barragem; Ar: Aracati; Bo: Bororé; Pe: Pedreira. T: temperatura; OD: oxigênio dissolvido; ST: sólidos totais; NO<sub>2</sub>: nitrito; NO<sub>3</sub>: nitrato; NH<sub>4</sub>: amônia; NDT: nitrogênio dissolvido total; NT: nitrogênio total; FT: fósforo total; Chl a: clorofila a; IET: índice de estado trófico; Classificação do IET: estado trófico (M: mesotrófico; E: eutrófico; S: supereutrófico; H: hipereutrófico); DCF: diclofenaco; CAF: cafeína; Al: alumínio; Ag: prata; Ba: bário; Cd: cádmio; Cr: cromo; Co: cobalto; Cu: cobre; Mn: manganês; Ni: níquel; Pb: chumbo; Sr: estrôncio; Zn: zinco. <LD: valores abaixo do limite de detecção do método.

### 3.2. Atividades das enzimas antioxidantes

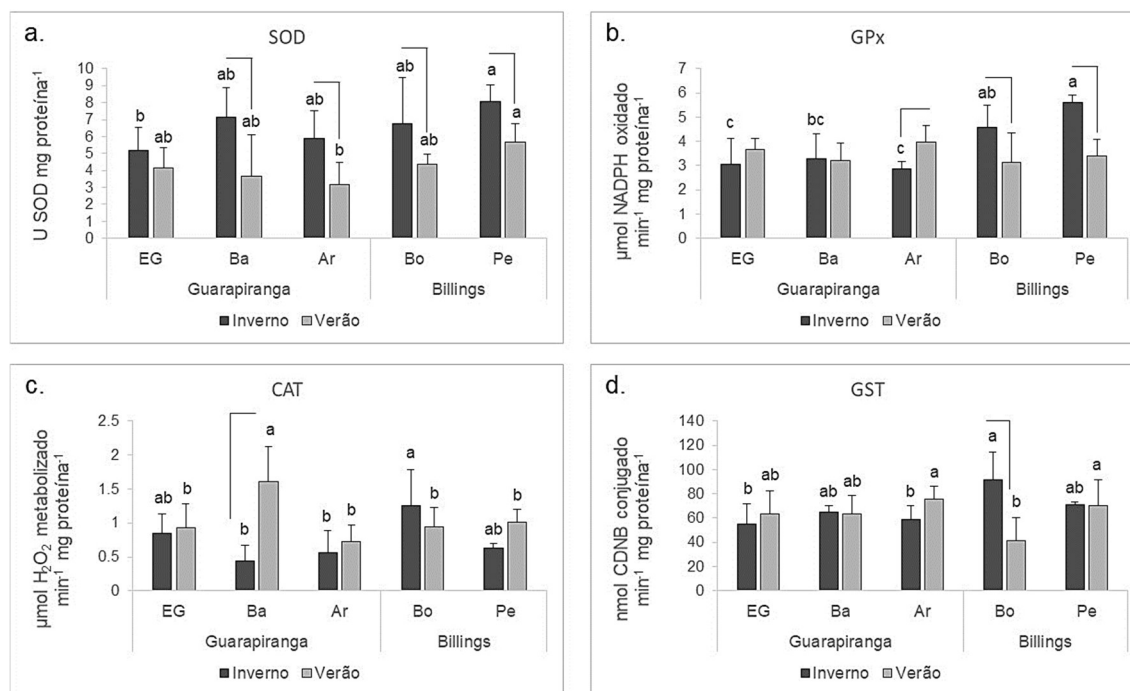
Nas brânquias, a atividade da enzima SOD no inverno foi maior nos peixes do ponto Pedreira comparado aos coletados em Embu-Guaçu, enquanto no verão, a atividade desta enzima foi maior nos animais de Pedreira comparado aos de Aracati (Figura 2a;  $p = 0,017$ ). A atividade desta enzima foi mais elevada no inverno em comparação com o verão nos animais de todos os pontos de coleta, exceto em Embu-Guaçu (Figura 2a;  $p < 0,001$ ).

A atividade da GPx só apresentou diferenças significativas nas brânquias entre os animais dos diferentes pontos de coleta na estação de inverno (Figura 2b;  $p = 0,006$ ), sendo maior nos peixes dos pontos Pedreira e Bororé em comparação aos animais coletados em Embu-Guaçu e Aracati, sendo ainda mais elevada em Pedreira em relação aos animais coletados em Barragem, também no inverno. No ponto Aracati, a atividade da GPx nas brânquias foi maior nos animais coletados no

verão do que no inverno, enquanto em Bororé e Pedreira, a atividade desta enzima foi maior no inverno do que em verão (Figura 2b;  $p < 0,001$ ).

A atividade branquial da enzima CAT por sua vez, na estação de inverno foi maior nos animais do ponto Bororé comparado aos da Barragem e Aracati; enquanto no verão foi maior na Barragem comparado à Embu-Guaçu, Aracati, Bororé e Pedreira (Figura 2c;  $p = 0,039$ ). A atividade desta enzima só evidenciou diferenças estatísticas entre as estações nos animais do ponto de Barragem, sendo maior no verão do que no inverno (Figura 2c;  $p = 0,004$ ).

Com relação à GST, no inverno a atividade desta enzima foi maior nas brânquias dos peixes de Bororé comparado com aqueles coletados em Embu-Guaçu e Aracati. No verão a atividade da GST foi menor nos animais de Bororé comparado aos de Aracati e Pedreira (Figura 2d;  $p < 0,001$ ). Bororé foi o único ponto no qual foram observadas diferenças significativas da atividade branquial desta enzima, entre as estações, sendo maior no inverno do que no verão (Figura 2d;  $p < 0,001$ ).



**Figura 2:** Atividade das enzimas antioxidantes nas brânquias de fêmeas de *A. altiparanae* no reservatório Guarapiranga (EG: Embu-Guaçu; Ba: Barragem; Ar: Aracati) e Billings (Bo: Bororé; Pe: Pedreira) no inverno/2017 e verão/2018 (Média  $\pm$  Desvio Padrão). Superóxido Dismutase (SOD) (a), Glutaciona Peroxidase (GPx) (b), Catalase (CAT) (c), Glutaciona S-

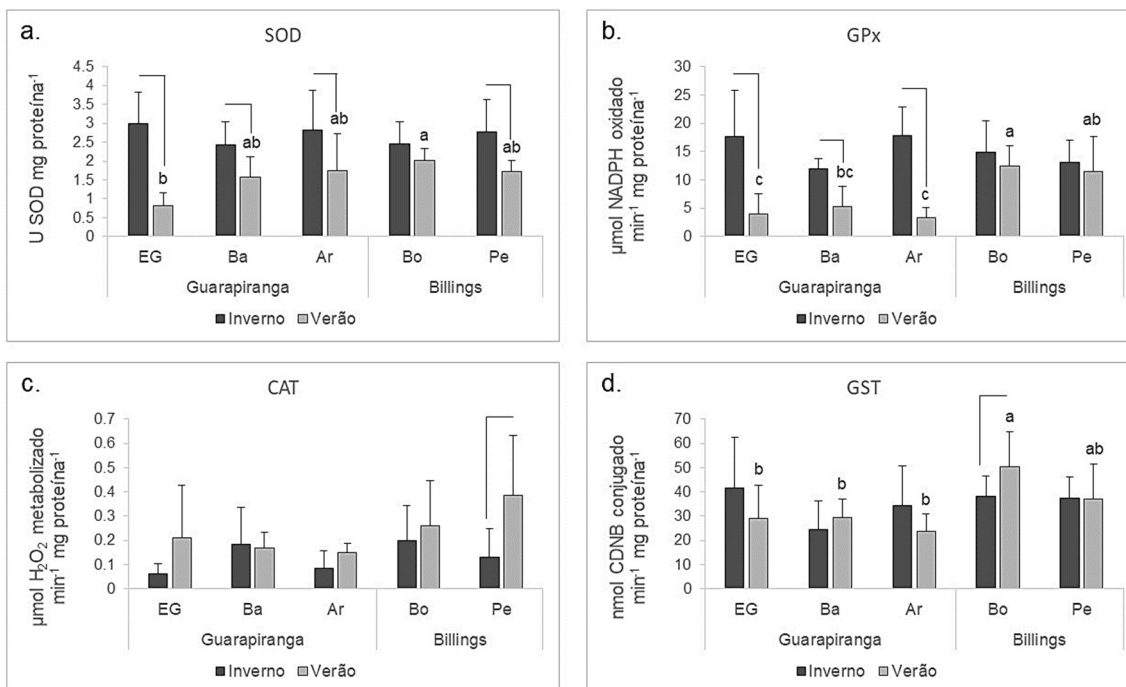
Transferase (GST) (d). <sup>abc</sup> Letras diferentes representam diferenças estatísticas significativas entre os pontos de coleta na mesma estação; linhas representam diferenças estatísticas significativas entre estações no mesmo ponto de coleta (ANOVA,  $p < 0,05$ ).

No fígado, a atividade da SOD não variou no inverno, entre os diferentes reservatórios e no verão foi maior nos peixes do ponto Bororé quando comparado aos animais de Embu-Guaçu (Figura 3a;  $p = 0,016$ ). Foi observada também alteração na atividade da SOD entre estações (Figura 3a;  $p < 0,001$ ), sendo maior no inverno nos peixes de Embu-Guaçu, Barragem, Aracati e Pedreira, com relação ao verão, mas sem alterações entre inverno e verão nos peixes coletados no Bororé.

Como observado para a enzima SOD, a GPx evidenciou alterações no fígado, entre os pontos de coleta, somente no verão (Figura 3b;  $p < 0,001$ ), sendo maior nos peixes de Bororé comparado aos de Embu-Guaçu, Barragem e Aracati, assim como também foi maior nos animais de Pedreira comparado aos de Embu-Guaçu e Aracati. A atividade da GPx também foi maior no fígado dos peixes coletados no inverno em comparação ao verão nos pontos do reservatório da Guarapiranga: Embu-Guaçu, Barragem e Aracati (Figura 3b;  $p < 0,001$ ).

A atividade da enzima CAT não se alterou no fígado das fêmeas entre os diferentes pontos de coleta, em ambas as estações (Figura 3c;  $p = 0,180$ ), porém, a atividade desta enzima foi maior no verão comparado ao inverno no fígado das fêmeas do ponto Pedreira (Figura 3c;  $p = 0,019$ ).

A atividade da enzima GST, assim como a SOD e a GPX não se alterou no inverno, mas apresentou diferenças estatísticas significativas entre os pontos de coleta no verão (Figura 3d;  $p = 0,002$ ), sendo maior no ponto Bororé comparado aos animais dos 3 pontos de coleta do reservatório da Guarapiranga: Embu-Guaçu, Barragem e Aracati. A atividade hepática desta enzima também foi maior nos peixes coletados no verão em comparação aos animais no inverno no ponto Bororé (Figura 3d;  $p = 0,028$ ).



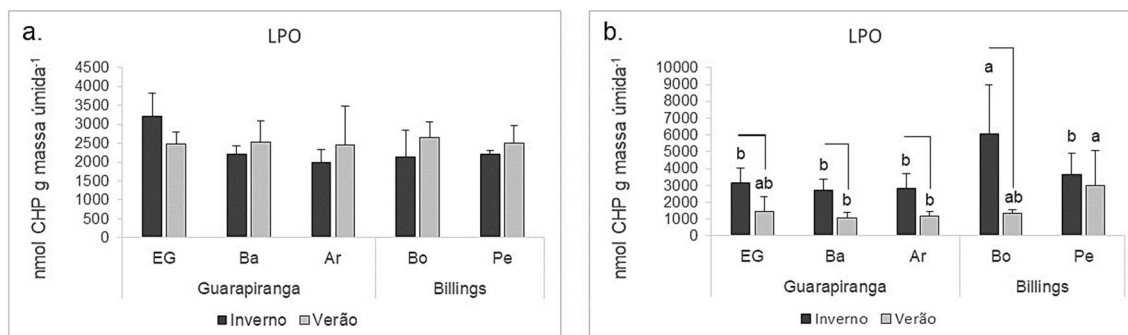
**Figura 3:** Atividade das enzimas antioxidantes no fígado das fêmeas de *A. altiparanae* no reservatório Guarapiranga (EG: Embu-Guaçu; Ba: Barragem; Ar: Aracati) e Billings (Bo: Bororé; Pe: Pedreira) no inverno/2017 e verão/2018. (Média  $\pm$  Desvio Padrão). Superóxido Dismutase (SOD) (a), Glutaciona Peroxidase (GPx) (b), Catalase (CAT) (c), Glutaciona S-Transferase (GST) (d). <sup>abc</sup> Letras diferentes representam diferenças estatísticas significativas entre os pontos de coleta na mesma estação; linhas representam diferenças estatísticas significativas entre estações no mesmo ponto de coleta (ANOVA,  $p < 0,05$ ).

### 3.3. Lipoperoxidação

Embora tenham sido observadas alterações na atividade das diferentes enzimas analisadas nas brânquias, não foram encontradas diferenças estatísticas significativas nos valores de LPO nas brânquias nos diferentes pontos de coleta tanto no inverno quanto no verão, (Figura 4a;  $p = 0,168$ ).

Ao contrário do que foi observado nas brânquias, os valores de LPO no fígado apresentaram diferenças significativas entre os pontos de coleta, nas duas estações (Figura 4b;  $p < 0,001$ ). No inverno a LPO foi maior nos peixes coletados em Bororé em comparação à Embu-Guaçu, Barragem, Aracati e Pedreira; enquanto no verão a LPO dos peixes da Pedreira foi maior do que nos animais da Barragem e Aracati. Em relação às diferenças entre estações, os valores de LPO foram

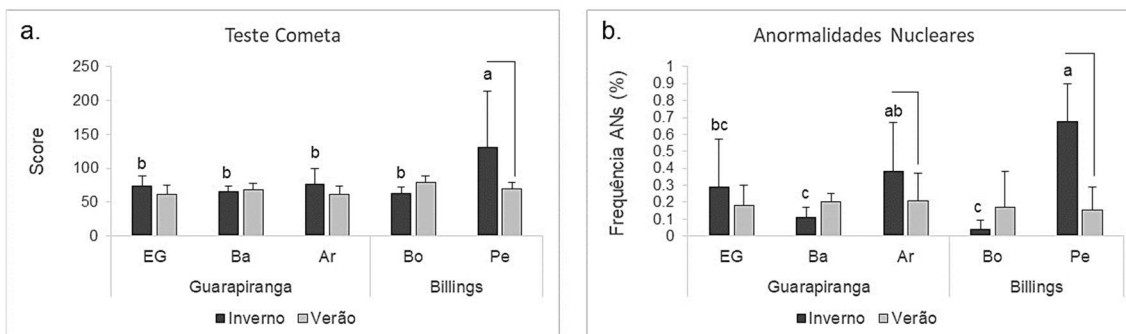
maiores no inverno do que no verão nos pontos de Embu-Guaçu, Barragem, Aracati e Bororé (Figura 4b;  $p < 0,001$ ).



**Figura 4:** Lipoperoxidação nas brânquias (a) e no fígado (b) das fêmeas de *A. altiparanae* no reservatório Guarapiranga (EG: Embu-Guaçu; Ba: Barragem; Ar: Aracati) e Billings (Bo: Bororé; Pe: Pedreira) no inverno/2017 e verão/2018. (Média  $\pm$  Desvio Padrão). <sup>ab</sup>Letras diferentes representam diferenças estatísticas significativas entre os pontos de coleta, na mesma estação; linhas representam diferenças estatísticas significativas entre estações no mesmo ponto de coleta (ANOVA,  $p < 0,05$ ).

#### 3.4. Biomarcadores genotóxicos

Os resultados dos biomarcadores genotóxicos evidenciaram diferenças estatísticas entre os pontos de coleta somente no inverno, sendo maior a fragmentação de DNA nos peixes da Pedreira em comparação aos outros pontos de coleta (Figura 5a;  $p < 0,001$ ). Não foram observados MN em nenhum ponto e em nenhuma estação. O número de AN também só variou no inverno (Figura 5b;  $p < 0,001$ ), sendo maior nos peixes da Pedreira comparado aos de Embu-Guaçu, Barragem e Bororé, e nos peixes de Aracati comparado aos de Barragem e Bororé. Com relação às diferenças entre estações do ano, os animais da Pedreira apresentaram maiores valores de fragmentação de DNA (Figura 5a;  $p < 0,001$ ) e AN (Figura 5b;  $p < 0,001$ ) no inverno; do mesmo modo, o número de AN dos peixes de Aracati foi maior no inverno quando comparado ao verão (Figura 5b;  $p < 0,001$ ).



**Figura 5:** Score do dano genético quantificado pelo teste cometa (a) e Número de anormalidades nucleares (b), em fêmeas de *A. altiparanae* no reservatório Guarapiranga (EG: Embu-Guaçu; Ba: Barragem; Ar: Aracati) e Billings (Bo: Bororé; Pe: Pedreira) no inverno/2017 e verão/2018. (Média ± Desvio Padrão). <sup>abc</sup>Letras diferentes representam diferenças estatísticas significativas entre os pontos de coleta, na mesma estação; linhas representam diferenças estatísticas significativas entre estações no mesmo ponto de coleta (ANOVA,  $p < 0,05$ ).

#### 4. Discussão

De modo geral, foi possível observar o intenso impacto antrópico ao qual ambos os reservatórios estão sujeitos, evidenciados pelos altos valores de compostos nitrogenados, fósforo total e clorofila-a encontrados, os quais refletem no grau de trofia. Adicionalmente, os resultados das variáveis físicas e químicas da água e as variáveis fisiológicas dos organismos permite afirmar que no inverno os animais estão expostos a uma maior carga estressora, evidenciado pela maior concentração de poluentes e contaminantes, além de maior atividade da maioria das enzimas antioxidantes analisadas, tanto nas brânquias quanto no fígado, LPO hepática e presença de danos genotóxicos nos peixes nesta época do ano.

No inverno, não foi observada variação no estado trófico entre os pontos de coleta, sendo a maioria dos pontos classificada como supereutrófico, exceto Embu-Guaçu, que apresentou melhor qualidade de água (eutrófico). Já no verão foi observada uma maior variação no grau de trofia entre os pontos de coleta, sendo Pedreira considerado o pior ponto (hipereutrófico), com maior concentração de sólidos totais, característica que pode estar relacionada à estação chuvosa, geralmente acompanhada de uma maior descarga de água do rio Pinheiros, causando a entrada de uma grande carga poluente dos efluentes domésticos que caracterizam este rio (Cardoso-Silva et al., 2014; CETESB, 2019). Este fato



favorece o crescimento de algas, principalmente as cianobactérias, como já tem sido relatado na Billings (Rocha-e-Silva et al., 2004; Gomes et al., 2018; CETESB, 2019), que também são consideradas um problema ecotoxicológico devido às toxinas que apresentam e que, em muitos casos podem causar o envenenamento da fauna aquática (WHO, 1999; CETESB, 2019).

Apesar de altos valores de compostos nitrogenados e fósforo também terem sido observados na Guarapiranga, principalmente no braço Aracati no inverno, segundo os valores de clorofila-a foi possível evidenciar que neste reservatório não existe tanta proliferação de microalgas quanto na Billings, o que pode estar relacionado com o amplo uso de sulfato de cobre para controlar o crescimento de algas, principalmente cianobactérias (Moschini-Carlos et al., 2010).

Porém, essa prática pode mascarar a depreciação dos corpos d'água em muitos casos, como foi observado em Aracati no inverno, onde foram encontrados valores de compostos nitrogenados até seis vezes maiores que em Barragem, Bororé e Pedreira; no entanto, mantendo o mesmo nível de classificação de trofia (supereutrófico) que os outros pontos, com exceção de Embu-Guaçu. Da mesma forma, foi no ponto Aracati, no inverno, que foi observado o menor valor de oxigênio dissolvido, o que pode estar relacionado ao processo de amonificação, no qual o oxigênio e o nitrato são consumidos (Mariani et al., 2006). A maior concentração de cafeína observada no Aracati pode ser usada como um indicador de efluente doméstico (Buerge et al., 2003), o que faz sentido devido à intensa ocupação irregular ao redor do braço Aracati, corroborando a alta deterioração da água nesse local. No entanto, o grau de trofia nem sempre é um indicador que propicia uma visão completa da qualidade de água, como é possível observar no presente estudo, pois reflete a degradação baseando-se apenas em nutrientes e clorofila-a, sem levar em consideração os outros contaminantes.

De todos os pontos monitorados, Embu-Guaçu foi o menos impactado, apesar de apresentar os maiores valores de alumínio e cromo; porém, foi o que apresentou menor carga de nutrientes, permitindo sua classificação como eutrófica no inverno e mesotrófica no verão. Este ponto fica próximo à entrada de água do rio Embu-Guaçu, ainda com amplas áreas naturais e conservadas ao seu redor

(Schunck e Rodrigues, 2016), o que pode contribuir para a diluição das águas e, portanto, dos compostos presentes.

Os ecossistemas podem estar expostos às baixas concentrações de contaminantes, como no caso dos fármacos por exemplo (Almeida e Weber, 2005), no entanto as ferramentas tradicionais não apresentam poder de detecção para avaliar qualidade de água levando em consideração estes compostos, como é feito para a medição de variáveis físicas e químicas, índices de biodiversidade ou mesmo variáveis morfométricas. Desta forma, os biomarcadores fisiológicos têm sido considerados ferramentas de grande utilidade para complementar o monitoramento ambiental, pois evidenciam alterações nos organismos como consequência de pequenas variações no ambiente (Bainy et al., 1996; Amiard-Triquet et al., 2013; Colin et al., 2016; Lennox et al., 2018).

No presente estudo foi possível observar maior atividade da enzima SOD no inverno nas brânquias dos peixes capturados nos pontos Barragem, Aracati, Bororé e Pedreira, em comparação aos peixes coletados nesses mesmos pontos no verão, corroborando os dados apresentados das variáveis físicas e químicas da água, com exceção dos animais da Pedreira, reservatório que apresentou maior grau de trofia no verão em relação ao inverno. No entanto, essa classificação foi baseada principalmente nos valores de clorofila-a e fósforo total, sem levar em consideração outras variáveis, como os metais, que foram encontrados em maior número e quantidade no ponto Pedreira, no inverno.

O exposto acima foi observado em geral na maioria dos pontos e pode estar relacionado à estação seca, quando há maior concentração de compostos nos reservatórios, enquanto no verão, como consequência das chuvas, ocorre a diluição destes compostos (Bogoni et al., 2014). É importante mencionar que nem todos os estudos de monitoramento ambiental têm recursos para medir todos os compostos químicos que podem estar presentes na água; portanto, os biomarcadores fisiológicos geralmente são indicadores da presença de um ou mais contaminantes, sendo por sua vez, um indicador do estado de saúde dos organismos que habitam o meio ambiente (Hoymack, 2010; Hook et al., 2014; Colin et al., 2016; Lennox et al., 2018).

Considerando-se os biomarcadores analisados, destaca-se a SOD, que é a primeira enzima a atuar no sistema de defesa antioxidante dismutando o íon superóxido e convertendo-o num composto mais solúvel como peróxido de hidrogênio (Matés, 2000; Atli et al., 2016). A atividade da SOD foi mais elevada nas brânquias dos peixes da Pedreira em comparação com os de Embu-Guaçu, no inverno e em comparação com os de Aracati no verão, sugerindo que os peixes da Pedreira estão expostos a compostos que desencadeiam maior produção de EROs, ativando o sistema de defesa dos organismos.

Por outro lado, a atividade da GPx não mostrou diferenças no verão, mas no inverno foi maior nos animais coletados na Billings, principalmente em Pedreira, em comparação aos da Guarapiranga, reforçando que os peixes da Billings podem estar sujeitos a um maior número de estressores, em comparação aos animais da Guarapiranga, fazendo com que seus sistemas de defesa fiquem mais ativos. Da mesma forma, uma maior atividade foi observada no inverno em relação ao verão, mas, neste caso, apenas nos animais dos pontos da Billings; enquanto na Guarapiranga apenas em Aracati foi observada diferença sazonal, sendo maior no verão.

Outra enzima que neutraliza a ação do peróxido de hidrogênio é a CAT, cuja atividade foi mais alta nas brânquias dos peixes da Barragem durante o verão. No entanto, a CAT atua contra danos mais graves devido à saturação com altas concentrações de peróxido (Matés, 2000; Atli et al., 2016), sendo assim estes dados podem indicar que algum contaminante está afetando a saúde dos organismos na Barragem. De todos os compostos analisados, o que poderia atrair atenção é a concentração de cobre, que foi maior na Barragem em comparação aos demais pontos (três vezes mais do que Aracati e quase 60 vezes mais do que Embu-Guaçu) no verão. O cobre é amplamente usado como algicida neste reservatório para controlar crescimento de cianobactérias, e já foi relatado que concentrações de 500  $\mu\text{g L}^{-1}$  pode causar a morte em peixes, devido à produção e coagulação do muco nas brânquias gerando asfixia (Moschini-Carlos et al., 2010). Porém, nesse mesmo ponto, o cobre foi mais alto no inverno, portanto, além do cobre, nesta estação algum outro composto que não foi analisado no presente estudo poderia estaria

presente, como a gasolina por exemplo, ou outros derivados de petróleo, considerando que esse ponto é próximo aos iate clubes, que possuem suas atividades de esportes aquáticos aumentadas durante o verão.

A enzima glutathione S-transferase (GST) é responsável pela conjugação da glutathione com os metabólitos gerados na primeira fase de desintoxicação dos organismos, produzindo compostos mais solúveis para que possam ser mais facilmente eliminados (Storey, 1996; Stepanova et al., 2013). A atividade dessa enzima foi maior no inverno nas brânquias dos peixes de Bororé, coincidindo com a atividade da CAT, podendo ser um indicador da presença de alguma substância não analisada neste estudo, que ativou o sistema de desintoxicação e defesa antioxidante.

Devido ao contato direto com a água, seria esperado que as brânquias fossem diretamente afetadas por contaminantes, evidenciando danos como a LPO (Islas-Flores et al., 2013); porém, no presente estudo não foi possível observar diferenças na LPO nas brânquias dos peixes entre pontos de coleta ou estações do ano, apesar de uma diferença notável nas atividades enzimáticas e nas variáveis físicas e químicas da água. Por um lado, pode ser que a ativação da atividade enzimática nos organismos tenha sido suficiente para evitar danos nas brânquias; mas também pode estar relacionado ao fato dos organismos apresentarem mecanismos de defesa eficientes e reparos de danos. Desta forma, em muitas avaliações ambientais, os biomarcadores de defesa são mais eficientes, mostrando que os animais estão lidando ativamente com a degradação ambiental, enquanto os biomarcadores de danos podem em alguns casos levar a uma má interpretação dos resultados (Amiard-Triquet et al., 2013).

No fígado, ao contrário das brânquias, não foram observadas diferenças nas atividades das enzimas antioxidantes entre os peixes dos diferentes pontos de coleta, na estação de inverno. No entanto, as atividades da SOD e GPx foram mais elevadas nos peixes coletados no inverno quando comparados com os animais amostrados do verão, perfil oposto ao encontrado na CAT e GST.

Em geral não foram observadas diferenças entre estações nos diferentes pontos, com exceção de uma maior atividade da CAT nos peixes coletados no verão

em Pedreira, reiterando a sugestão de que neste ponto e estação do ano os animais se encontram sob maior carga estressora devido ao ingresso das águas do rio Pinheiros, considerando-se o papel da CAT em atuar frente a danos mais severos.

Com relação à GST apesar do menor grau de trofia no ponto Bororé, no verão, sua atividade hepática foi maior nesta estação. Porém, é importante lembrar que este ponto tem influência das águas da Pedreira e grande ocupação urbana com baixa cobertura sanitária ao redor, e que, além dos nutrientes, é provável que outros compostos não avaliados no presente estudo possam ter desencadeado o processo de detoxificação nos organismos. No ponto do Bororé, a única variável que apresentou concentração elevada no verão foi o zinco, sendo quase o dobro da concentração nos pontos da Guarapiranga, e até sete vezes maior do que na Pedreira. O zinco é um metal essencial para todas as formas de vida, uma vez que participa de várias funções biológicas, e sabe-se que nos peixes uma deficiência de zinco contribui para anorexia, baixo crescimento, deformação dos ossos, baixas taxas de sobrevivência; além do fato deste metal regular a transcrição de genes através do fator de transcrição-1 sensível ao metal (Mtf1) (Hogstrand, 2011). No entanto, altas concentrações podem levar a toxicidade, e já tem sido relatado que concentrações entre 10 e 200  $\mu\text{g L}^{-1}$  podem diminuir a sobrevivência e afetar parâmetros reprodutivos, como a fertilidade em diferentes espécies de peixes (*Cottus bairdii*, *Phoxinus phoxinus*, *Cirrhinus mrigala*) (Hogstrand, 2011).

Os dados aqui encontrados deixam evidente que cada órgão pode responder de maneira particular aos diferentes estressores, destacando a importância de avaliar diferentes tecidos na escolha de biomarcadores como ferramentas para monitoramento ambiental (Pérez-Coyotl et al., 2017). Este fato fica mais evidente quando observamos as respostas de LPO, que variaram no fígado entre os pontos de coleta e estação do ano, mas não se alteraram nas brânquias. Apesar das brânquias estarem em contato direto com a água e, portanto, com os contaminantes, o fígado é o principal órgão que metaboliza os compostos xenobióticos, motivo pelo qual está mais exposto ao efeito das EROs resultantes do processo metabólico, e é mais suscetível aos danos oxidativos (Guiloski et al., 2017; Pérez-Coyotl et al., 2017). Vieira et al. (2016) também não observaram LPO nas

brânquias de *Prochilodus lineatus* em locais com alta carga de pesticidas, enquanto no fígado foi possível observar esses danos.

Os resultados da LPO reforçam o que foi discutido anteriormente, a ocorrência de mais alterações nos animais durante o inverno em relação ao verão, o que pode estar relacionado à diluição dos compostos contaminantes no verão devido às chuvas características desta estação (Rocha-e-Silva et al., 2004). Evidentemente, esse não é o caso de Pedreira, único ponto em que não houve diferença na LPO entre as estações, possivelmente pela influência do rio Pinheiros, que contribui com grande carga de poluentes, mesmo no verão. Adicionalmente, este foi um ponto com maior LPO hepática no verão, principalmente quando comparada aos peixes da Barragem e Aracati.

No inverno, os peixes coletados em Bororé apresentaram o maior valor de LPO hepático em relação a todos os outros pontos, mesmo não ocorrendo alterações na atividade das enzimas antioxidantes do fígado entre os diferentes pontos de coleta nesta estação. O parâmetro que mais se destaca em Bororé durante o inverno, é a alta concentração de clorofila-a, que foi até três vezes maior do que nos demais pontos, sendo representada principalmente por cianobactérias (Gomes et al., 2018), podendo estar relacionado a um efeito tóxico das toxinas presentes nestes microrganismos (CETESB, 2019), mas também pode estar relacionado a outros compostos não medidos no presente estudo, ou até mesmo à interação entre eles.

A combinação dos resultados das brânquias e do fígado deixam evidente que de forma geral os animais da Billings estão sujeitos a uma maior carga estressora que os peixes de Guarapiranga. Além disso, é possível estabelecer uma influência sazonal nas respostas fisiológicas dos organismos, permitindo sugerir que durante o inverno os animais estão sob maior estresse ambiental em comparação ao verão. Isso também foi observado e relatado por outros autores que usaram biomarcadores de estresse oxidativo em peixes no ambiente natural (Vieira et al., 2017; Calado et al., 2019).

Quando os níveis de estresse excedem a capacidade do sistema de defesa dos organismos, ocorrem danos a moléculas importantes, como lipídios, proteínas

e DNA. O dano genético geralmente está associado ao estresse oxidativo, porque, uma vez que há danos às membranas lipídicas como consequência da LPO, o material genético nas células fica mais exposto ao dano oxidativo devido ao aumento na permeabilidade das membranas das células (Vieira et al., 2016; Pérez-Coyotl et al., 2017; Pérez et al., 2018).

No presente estudo, a influência sazonal observada nos biomarcadores de estresse oxidativo também foi evidenciada com os biomarcadores de genotoxicidade, com maior fragmentação do DNA nos peixes da Pedreira durante o inverno em comparação ao verão; porém, este biomarcador não mostrou diferenças entre os pontos nas duas estações. O teste cometa é um biomarcador sensível, que responde rapidamente às mudanças ambientais (Rocco et al., 2011; Braham et al., 2017), no entanto, os danos evidenciados por este método usualmente são reparáveis (Kienzler et al., 2013), contudo em exposições crônicas, os teste de MN e AN são mais recomendados, pois mostram danos que não podem ser reparados (Rocco et al., 2011; Braham et al., 2017). Semelhante ao observado com o teste cometa, as AN apresentaram uma maior frequência nos animais da Pedreira, assim como os de Aracati durante o inverno, sem variações nos biomarcadores de genotoxicidade durante o verão. Estes dados corroboram com os dados de Bogoni et al. (2014) que observaram um número maior de MN nos eritrócitos de *Astyanax bifasciatus* coletados no rio Engano durante a estação seca, em comparação com aqueles coletados na estação chuvosa.

A ausência de MN nos animais de todos os pontos de coleta e nas duas estações de monitoramento não era esperado, pois eles são indicadores sensíveis da exposição crônica aos poluentes (Bogoni et al., 2014), e a espécie do presente estudo tem sido relatada como sensível à detecção de efeitos genotóxicos através do teste de MN (Francisco et al., 2019). Alguns autores sugerem que peixes pelágicos e onívoros têm maior frequência de AN do que MN (Braham et al., 2017). Até hoje o mecanismo de formação da AN não é claro. Shimizu et al. (1998) há duas décadas sugeriram que as AN podem ser consequência de um processo de reparo do material genético, no qual o dano é eliminado por meio de exocitose, deixando finalmente a membrana nuclear com alguma imperfeição. Isso faz sentido, uma vez

que os organismos têm uma alta capacidade de reparar danos (Amiard-Triquet et al., 2013; Colin et al., 2016; Pérez-Coyotl et al., 2017). Esse mecanismo já foi amplamente divulgado em peixes, sendo um dos principais motivos pelo qual a quebra de DNA, evidenciada pelo teste do cometa nem sempre reflete o estado do ambiente (Rocco et al., 2011; Braham et al., 2017).

Desta forma, os resultados dos biomarcadores que indicam danos genotóxicos devem ser interpretados com muito cuidado, devido à capacidade dos organismos de se defenderem dos compostos xenobióticos e repararem danos. Alguns resultados podem refletir um processo adaptativo das populações à contaminação e não a ausência de compostos xenobióticos (Colin et al., 2016), o que pode ser observado no presente estudo, no qual os danos genéticos medidos pelo teste cometa não evidenciaram diferenças entre os pontos de coleta (exceto Pedreira) apesar da análise de água sugerir que os peixes coletados em Embu-Guaçu estejam menos expostos aos estressores, quando comparados aos demais pontos de coleta.

## **5. Conclusão**

Os resultados do presente estudo mostraram a importância de avaliar biomarcadores em diferentes tecidos, bem como selecionar diferentes tipos de biomarcadores, devido às diferenças nas respostas de cada um deles. De forma geral foi possível observar que os animais da Billings, principalmente no ponto Pedreira, estão sujeitos a uma maior carga estressora do que os peixes da Guarapiranga. Também foi possível observar que no inverno, quando há maior concentração de compostos xenobióticos devido à ausência de chuvas, o sistema de defesa antioxidante dos organismos é mais ativo e é possível observar maiores danos em geral. Apesar da dificuldade de relacionar as respostas dos biomarcadores com certos contaminantes, característica comum nos estudos de campo, o presente estudo mostrou a importância do uso de biomarcadores fisiológicos para o monitoramento ambiental, uma vez que essas ferramentas nos permitem ter uma visão mais ampla das condições ambientais, através de



alterações nos organismos, constituindo um complemento adequado para a avaliação de variáveis físicas e químicas e indicadores de biodiversidade.

## **Agradecimentos**

Este estudo teve o suporte financeiro dos processos: 2017/11530-1 e 2014/16320-7 da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (Processo nº 152753/2017-6) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - (CAPES) - Código de financiamento 001. Bolsista CNPq (152753/2017-6). Os autores agradecem também à equipe de LAMEROA (IB-USP) por toda a ajuda, o Laboratório de Evolução e Desenvolvimento de Invertebrados (Prof. Federico Brown) da Universidade de São Paulo (IB-USP) por disponibilizar o microscópio de fluorescência e ao IB-USP pela logística e facilidades.

## **6. Referências**

- Almeida, G.A., Weber, R.R. 2005. Fármacos na represa Billings. *Revista Saúde e Ambiente* 6(2), 7-13.
- Al-Sabti, K., Metcalfe, C.D. 1995. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutation Research* 343, 121–135.
- Amiard-Triquet, C., Jean-Claude, A., Rainbow, P.S. 2013. *Ecological Biomarkers Indicators of Ecotoxicological Effects*. CRC Press, U.S. 434 p.
- Atli, G., Canli, E.G., Eroglu, A., Canli, M. 2016. Characterization of antioxidant system parameters in four freshwater fish species. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 126, 30-37.
- Bainy, A.C.D., Saito, E., Carvalho, P.S.M., Junqueira, V.B.C. 1996. Oxidative stress in gill, erythrocytes, liver and kidney of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from a polluted site. *Aquatic Toxicology* 34, 151-162.
- Bertolucci, B., Vicentini, C.A., Vicentini, I.B.F., Bombonato, M.T.S. 2008. Light microscopy and ultrastructure of the liver of *Astyanax altiparanae* Garutti and

- Britski, 2000 (Teleostei, Characidae). *Acta Scientiarum. Biological Sciences* 30, 73–76.
- Beutler, E. 1975. Catalase. In E. Beutler (Ed.), *Red Cell Metabolism. A manual of biochemical methods*. New York: Grune and Stratton. P. 89-90.
- Bogoni, J.A., Armiliato, N., Araldi-Favassa, C.T., Techio, V.H. 2014. Genotoxicity in *Astyanax bimaculatus* (Twospot *Astyanax*) Exposed to the Waters of Engano River (Brazil) as Determined by Micronucleus Testes in Erythrocytes. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 66, 441–449.
- Bógus, L., Pasternak, S. 2019. Mapa social de la Región Metropolitana de São Paulo: desigualdades espaciales. *Andamios* 16 (39), 151-175.
- Braham, R.P., Blazer, V.S., Shaw, C.H., Mazik, P.M. 2017. Micronuclei and Other Erythrocyte Nuclear Abnormalities in Fishes from the Great Lakes Basin, USA. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 58, 570-581.
- Buerge, I.J., Poiger, T., Muller, M.D., Buser, H. 2003. Caffeine, an anthropogenic marker for wastewater contamination of surface waters. *Environmental Science & Technology* 37(4), 691-700.
- Calado, S.L.M., Andrade, M.C., Garrido, F., Pelanda, A., Lirolla, J., Salgado, L.D., Cestari, M.M., de Assis, H.C.S. 2019. Biochemical and genotoxicity assessment of a polluted urban river using the native fish *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski (Teleostei, Characidae). *Ecotoxicology and Environmental Contamination* 14 (1), 73-77.
- Cardoso-Silva, S., Nishimura, P.Y., Padial, P.R., Mariani, C.F., Moschini-Carlos, V., Pompêo, M.L.M. 2014. Compartimentalização e qualidade da água: o caso da Represa Billings. *Bioikos* 28 (1),31-43.
- Carrasco, K.R., Tilbury, K.L., Myers, M.S. 1990. Assessment of the piscine micronucleus teste as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 47, 2123–2136.
- CETESB. 2019. Qualidade das águas interiores no Estado de São Paulo 2018. São Paulo, 284 p. [Recurso electrónico]. <https://cetesb.sp.gov.br/aguas-interiores/wp-content/uploads/sites/12/2019/10/Relat%C3%B3rio-de-Qualidade-das-%C3%81guas-Interiores-no-Estado-de-SP-2018.pdf>

- Colin, N., Porte, C., Fernandes, D., Barata, C., Padrós, F., Carrassón, M., Monroy, M., Cano-Rocabayera, O., de Sostoa, A., Piña, B., Maceda-Veiga, A. 2016. Ecological relevance of biomarkers in monitoring studies of macro-invertebrates and fish in Mediterranean rivers. *Science of the Total Environment* 540, 307–323. FABHAT (Fundação Agência da Bacia Hidrográfica do Alto Tietê). 2016. Relatório – I Plano de Bacia Hidrográfica do Alto Tietê - UGRHI 06. Ano Base 2016/2035. 257 pp.
- Collins, AR., Oscoz, A.A., Brunborg, G., Gaivão, I., Giovannelli, L., Kruszewski, M., Smith, C.C., Štětina, R. 2008. The comet assay: topical issues. *Mutagenesis* 23 (3), 143–151.
- EMAE. 2002. Empresa Metropolitana de Águas e Energia S.A. Disponível em: <<http://www.emae.sp.gov.br>>. Acesso: 26 de setembro de 2017.
- Fontana, L., Albuquerque, A.L.S., Brenner, M., Bonotto, D.M., Sabaris, T.P., Pires, M.A., Cotrim, M.E.B., Bicudo, D.C. 2014. The eutrophication history of a tropical water supply reservoir in Brazil. *Journal of Paleolimnology* 51, 29–43.
- Francisco, C.M., Bertolino, S.M., de Oliveira Júnior, R.J., Morelli, S., Pereira, B.B. 2019. Genotoxicity assessment of polluted urban streams using a native fish *Astyanax altiparanae*. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* 82 (8), 514–523.
- Garutti, V., Britski, H.A., 2000. 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 e Tecnologia PUC Série Zoologia* 13, 65–88.
- Gomes, A.D., Tolussi, C.E., Ribeiro, C.S., Honji, R.M. Moreira, R.G. 2015. The role of ovarian steroids in reproductive plasticity in *Hoplias malabaricus* (Teleostei: Characiformes: Erythrinidae) in tropical reservoirs with different degrees of pollution. *General and Comparative Endocrinology* 222, 1–10.
- Gomes, A.D., Tolussi, C.E., Boëchat, I.G., Pompêo, M.L.M., Cortez, M.P.T., Honji, R.M., Moreira, R.G. 2016. Fatty Acid Composition of Tropical Fish Depends on Reservoir Trophic Status and Fish Feeding Habit. *Lipids* 51, 1193-1206.

- Gomes, A.D., Tolussi, C.E., Figueredo, C., Gomes, F.R., Godoi, F.G.A., Boechat, I.G., Oliveira, L.C., Peñuela, M.M., Pompeo, M.L.M., Rojas, M.S., Lima, R., Marques, V.H.L., Moreira-Whitton, R.G., 2018. Relationship between composition of phytoplankton community and fatty acids profile of omnivorous fish from reservoir with different eutrophication degree. 13th International Congress on the Biology of Fish, 2018, Calgary, Canada.
- Guiloski, I.C., Piancini, L.D.S., Dagostim, A.C., Calado, S.L.M., Fávoro, L.F., Boschen, S.L., Cestari, M.M., Cunha, C., Assis, H.C.S. 2017. Effects of Environmentally Relevant Concentrations of the Anti-Inflammatory Drug Diclofenac in Freshwater Fish *Rhamdia quelen*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 139, 291-300.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B. 1974. Glutathione S-Transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry* 249 (22), 7130-7139.
- Hermes-Lima, M., Willmore, W.G., Storey, K.B. 1995. Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe (III) xylenol organe complex formation. *Free Radical Biology & Medicine* 19 (3), 271-280.
- Hogstrand, C. 2011. Zinc. Homeostasis and Toxicology of Essential Metals. *Fish Physiology* 31, Part A, 135-200.
- Homyack, J.A. 2010. Evaluating habitat quality of vertebrates using conservation physiology tools. *Wildlife Research* 37, 332–342.
- Hopkins, J., Tudhope, G. R. 1973. Glutathione peroxidase in human red cells in health and disease. *Journal of Haematology* 25, 563-575.
- Hook, S.E., Gallagher, E.P. Batley, G.E. 2014. The Role of Biomarkers in the Assessment of Aquatic Ecosystem Health. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 10 (3), 327–341.
- Islas-Flores, H., Gómez-Oliván, L. M., Galar-Martínez, M., Colín-Cruz, A., Neri-Cruz, N., García-Medina, S. 2013. Diclofenac-induced oxidative stress in brain, liver, gill and blood of common carp (*Cyprinus carpio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 92, 32-38.

- Jackson, P., Pedersen, L. M., Kyjovska, Z. O., Jacobsen, N. R., Saber, A. T., Hougaard, K. S., Vogel, U., Wallin, H. 2013. Validation of freezing tissues and cells for analysis of DNA strand break levels by comet assay. *Mutagenesis* 28 (6), 699-707.
- Kienzler, A., Bony, S., Devaux, A. 2013. DNA repair activity in fish and interest in ecotoxicology: A review. *Aquatic Toxicology* 134– 135, 47– 56.
- Lamparelli, M.C. 2004. Grau de trofia em corpos d'água do estado de São Paulo: avaliação dos métodos de monitoramento. Universidade de São Paulo.
- Livingstone, D.R. 2001. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Marine Pollution Bulletin* 42 (8), 656-666.
- Lennox, R.J., Suski, C.D., Cooke, S.J. 2018. A macrophysiology approach to watershed science and management. *Science of the Total Environment* 626, 434–440.
- López-Doval, J.C., Meirelles, S.T., Cardoso-Silva, S., Moschini-Carlos, V., Pompêo, M. 2016. Ecological and toxicological responses in a multistressor scenario: Are monitoring programs showing the stressors or just showing stress? A case study in Brazil. *Science of the Total Environment* 540, 466–476.
- López-Doval, J.C., Montagner, C.C., de Albuquerque, A.F., Moschini-Carlos, V., Umbuzeiro, G., Pompêo, M. 2017. Nutrients, emerging pollutants and pesticides in a tropical urban reservoir: Spatial distributions and risk assessment. *Science of the Total Environment* 575, 1307–1324.
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.I., Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biology Chemistry* 193, 265-275.
- Marceniuk, A.P., Hilsdorf, A.W.S. 2010. Peixes das cabeceiras do Rio Tietê e Parque das Neblinas. *Ócsso Design*, São Paulo, p. 160p.
- Mariani, C.F., Moschini-Carlos, V., Brandimarte, A.L., Nishimura, P.Y., Tófoli, C.F., Duran, D.S., Lourenço, E.M., Braidotti, J.C., Almeida, L.P., Fidalgo, V.H., Pompêo, M.L.M. 2006. Biota and water quality in the Riacho Grande reservoir, Billings Complex (São Paulo, Brazil). *Acta Limnologica Brasileira*, 18 (3): 267-280.

- Marques, V.H., Moreira, R.G., Gomes, A.D. 2020. Influence of tropical reservoirs eutrophication on the polyunsaturated fatty acid profile in *Astyanax altiparanae* (Pisces: Characidae). *Science of the Total Environment* 717, 137182.
- Matés, J.M. 2000. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology* 153, 83-104.
- McCord, J.E. Fridovich, I. 1969. Superoxide dismutase an enzymatic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *Journal of Biological Chemistry* 244, 6049-6055.
- Montagner, C.C., Sodr , F.F., Acayaba, R.D., Vidal, C., Campestrini, I., Locatelli, M.A., Pescara, I.C., Albuquerque, A.F., Umbuzeiro, G.A., Jardim, W.F. 2019. Ten Years-Snapshot of the Occurrence of Emerging Contaminants in Drinking, Surface and Ground Waters and Wastewaters from São Paulo State, Brazil. *Journal of Brazilian Chemistry Society* 30 (3), 614-632.
- Moschini-Carlos, V., de Freitas, L.G., Pompêo, M. 2010. Limnological evaluation of water in the Rio Grande and Taquacetuba branches of the Billings Complex (São Paulo, Brazil) and management implications. *Revista Ambiente &  gua* 5 (3), 47-59.
- Pérez, M.R., Rossia, A.S., Bacchetta, C., Elorriaga, Y., Carriquiriborde, P., Cazenave, J. 2018. In situ evaluation of the toxicological impact of a wastewater effluent on the fish *Prochilodus lineatus*: biochemical and histological assessment. *Ecological Indicators* 84, 345–353.
- Pérez-Coyotl, I., Martínez-Vieyra, C., Galar-Martínez, M., Gómez-Oliván, L.M., García-Medina, S., Islas-Flores, H., Pérez-Pasten, R., Gasca-Pérez, E., Novoa-Luna, K.A., Dubl n-García, O. 2017. DNA damage and cytotoxicity induced on common carp by pollutants in water from an urban reservoir. Mad n reservoir, a case study. *Chemosphere* 185, 789-797.
- Rocha-e-Silva, T.A.A., Rantin, F.T., Matsumura-Tundisi, J.E., Matsumura-Tundisi, T., Tundisi, J.G., Degtere, I.A. 2004. Dynamics of cytochrome P450 inducers in polluted sites of São Paulo city reservoirs. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 59, 109–115.

- Rocco, L., Frenzilli, G., Fusco, D., Peluso, C., Stingo, V. 2011. Evaluation of zebrafish DNA integrity after exposure to pharmacological agents present in aquatic environments. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73, 1530-1536.
- Schunck, F., Rodrigues, K.E. 2016. Avifauna do Parque Estadual da Várzea do rio Embu-Guaçu e sua importância para a conservação das aves de várzea da porção Sudoeste da Região Metropolitana de São Paulo, Brasil. *Ornithologia* 9 (2), 58-79.
- Shihomatsu, H.M., Martins, E.A.J., Cotrim, M.E.B., Lebre, D.T., Ortiz, N., Pires, M.A.F. 2017. Guarapiranga Reservoir-Pharmaceuticals and Historical Urban Occupation in a Water Source. *Journal of Geoscience and Environmental Protection* 5, 1-17.
- Shimizu, N., Itoh, N., Utiyama, H., Wahl, G.M. 1998. Selective entrapment of extrachromosomally amplified DNA by nuclear budding and micronucleation during S-phase. *Journal of Cell Biology* 140, 1307–1320.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L.A. 1988. Single technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research* 175, 184–191.
- Stepanova, S., Praskova, E., Chromcova, L., Pihalova, I., Prokes, M., Blahova, J., Svobodova, Z. 2013. The effects of diclofenaco on early life stages of common carp (*Cyprinus carpio*). *Environmental Toxicology and Pharmacology* 35, 454-460.
- Storey, K.B. 1996. Oxidative Stress: animal adaptations in nature. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 29, 1715-1733.
- Tolussi, C.E., Gomes, A.D.O., Kumar, A., Ribeiro, C.S., Lo Nostro, F.L., Bain, P.A., de Souza, G.B., Da Cuña, R., Honji, R.M., Moreira, R.G. 2018. Environmental pollution affects molecular and biochemical responses during gonadal maturation of *Astyanax fasciatus* (Teleostei: Characiformes: Characidae). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 147, 926–934.
- Vieira, C.E.D., Costa, P.G., Lunardelli, B., de Oliveira, L.F., Cabrera, L.C., Risso, W.E., Primel, E.G., Meletti, P.C., Fillmann, G., Martinez, C.B.R. 2016. Multiple biomarker responses in *Prochilodus lineatus* subjected to short-term in situ

exposure to streams from agricultural areas in Southern Brazil. *Science of the Total Environment* 542, 44–56.

Vieira, C.E.D., Costa, P.G., Cabrera, L.C., Primel, E.G., Fillmann, G., Bianchini, A., Martinez, C.B.R. 2017. A comparative approach using biomarkers in feral and caged Neotropical fish: Implications for biomonitoring freshwater ecosystems in agricultural areas. *Science of the Total Environment* 586, 598–609.

WHO. 1999. *Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management*. Edited by: Ingrid Chorus and Jamie Bartram. E & FN Spon, London.



## DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

Embora os estudos de laboratório sejam necessários para identificar os efeitos de poluentes específicos nos organismos aquáticos, sendo possível relacionar estes efeitos com o que ocorre no ambiente natural na presença desses compostos, é importante entender que a capacidade que se tem no laboratório para representar os estressores naturais é, na maioria dos casos, limitada. No campo, os animais são expostos às misturas de muitos poluentes que mudam constantemente de concentração, além das interações com as variáveis químicas e físicas da água, como temperatura, pH, oxigênio e turbidez dentre outros (Hook et al., 2014). Portanto, é difícil estabelecer que um efeito observado em laboratório, quando o animal está exposto a um composto específico, ocorrerá da mesma forma no campo, na presença deste composto (Galindo e Moreira, 2009).

A principal dificuldade e limitação do presente trabalho foi poder realizar análise de concentração dos fármacos do estudo (DCF e CAF) nos tecidos dos peixes, tanto em campo quanto em laboratório, um dos objetivos iniciais do projeto. Porém, apesar de terem sido estabelecidos contatos com alguns laboratórios que realizam estas análises, não foi possível obter colaborações ou obter recursos financeiros para estas análises, principalmente pelo elevado número de amostras, sendo priorizadas as análises de água no laboratório e no campo. No campo, a concentração de DCF foi abaixo do limite de detecção, exceto em Aracati (Guarapiranga) no inverno, local onde a concentração de CAF também foi mais elevada. No entanto, embora com a presença de ambos os fármacos, não foram encontrados os mesmos resultados nos biomarcadores dos ensaios de laboratório neste ponto de coleta, nem mesmo na exposição subcrônica, possivelmente devido às baixas concentrações presentes no campo. Além disso, no ambiente natural, os animais foram possivelmente expostos a muitos outros poluentes, sendo assim, a resposta nas atividades enzimáticas poderia estar mais relacionada com algum outro composto ou a interação da mistura de poluentes e as condições ambientais.

Nos bioensaios agudo e subcrônico, houve tendência à inibição das enzimas do sistema antioxidante hepático, principalmente sob exposição ao DCF; porém na

exposição aguda à CAF também houve efeito inibitório de algumas enzimas. Diferentemente do bioensaio agudo, a exposição subcrônica à CAF não mostrou efeito nas enzimas do sistema antioxidante branquial ou hepático, o que pode indicar que, em baixas concentrações, esse composto não apresenta toxicidade nesses organismos. Supreendentemente, no bioensaio agudo, a CAF foi o fármaco que gerou LPO hepática em contraste com o DCF, que foi o que demonstrou um maior efeito sobre a atividade das enzimas antioxidantes. O fato do DCF, um dos fármacos considerados dentre os mais tóxicos para a fauna, não gerar LPO em nenhum bioensaio, pode ser devido ao curto período de exposição no experimento agudo, enquanto no subcrônico pode ser uma consequência das baixas concentrações de exposição, que não geraram suficientes EROs para produzir algum dano. No entanto, no bioensaio subcrônico, só foi observada LPO hepática nos animais expostos à mistura dos fármacos, observando um efeito potencializador dos fármacos no dano nas membranas celulares. Desta forma, os resultados de ambos bioensaios demonstraram que o DCF, separado ou combinado com CAF, induz estresse oxidativo hepático em *A. altiparanae* em duas situações distintas: altas concentrações por curto período de exposição e baixa concentração por um período maior de exposição. No entanto, a CAF parece ter efeito tóxico apenas quando as concentrações são altas, mesmo por curtos períodos.

Diferentemente dos peixes dos bioensaios, nos animais de campo não foi observada inibição nas enzimas antioxidantes, nem no fígado nem nas brânquias. De forma contrária, nos pontos de maior poluição foi observada uma maior atividade destas enzimas nos animais coletados. No ambiente natural os animais podem ter passado por um processo de aclimação ao ambiente poluído mantendo ativo seus sistemas de defesas para evitar danos oxidativos (Amiard-Triquet et al., 2013; Colin et al., 2016). No laboratório, mesmo em uma exposição subcrônica de 14 dias, como os animais, originários de uma piscicultura, não foram anteriormente expostos a compostos xenobióticos, pode ocorrer um excesso de EROs, desnaturando as enzimas (Ruas et al., 2008), o que se reflete na sua baixa atividade.

Nos bioensaios agudo e subcrônico, assim como no campo, as brânquias apresentam baixa resposta na atividade das enzimas antioxidantes e LPO quando

expostas aos xenobióticos, quando comparadas às respostas hepáticas. No entanto, a baixa resposta aos biomarcadores analisados não pode ser considerado um indicador de que este órgão não esteja sendo comprometido. Este fato pode ser simplesmente um indicador de que, para avaliar os efeitos de compostos xenobióticos nas brânquias, outros tipos de biomarcadores devem ser selecionados, como aqueles relacionados à osmorregulação, ou ainda biomarcadores histológicos. Por outro lado, biomarcadores de estresse oxidativo são uma excelente opção no fígado, uma vez que este é o principal órgão envolvido no metabolismo, sendo mais exposto aos danos oxidativos por EROs (Guiloski et al., 2017; Pérez-Coyotl et al. 2017).

A atividade da AChE também tem sido comumente utilizada para identificar contaminação por pesticidas em estudos em ambiente natural (Hook et al., 2014). No entanto, apesar de no presente estudo não ter sido possível medir a atividade dessa enzima nos peixes de campo, os resultados obtidos em laboratório mostram que compostos farmacológicos também podem alterar a atividade desta enzima. A exposição subcrônica à CAF e ao DCF, separados ou combinados, inibe a atividade da AChE no músculo de *A. altiparanae*, podendo comprometer as atividades motoras desses animais e afetando sua sobrevivência. Desta forma, consideramos a AChE como um biomarcador adequado em monitoramentos ambientais, sem necessariamente ser específico para avaliar a presença de pesticidas.

É evidente a dificuldade em interpretar as respostas dos biomarcadores analisados nos animais em campo, devido à complexidade dos organismos e suas interações com o grande número de fatores presentes no ambiente natural. No entanto, biomarcadores de defesa mais gerais, como os avaliados neste projeto, são ideais para monitoramento ambiental, fornecendo informações sobre o estado de conservação de um corpo d'água, pois permitem observar se os organismos estão expostos a poluentes, quando não há a necessidade de discriminar o tipo de composto (Amiard-Triquet et al., 2013). No trabalho de campo por exemplo, por meio dos biomarcadores de estresse oxidativo, foi possível observar que os animais da Billings estão sob o efeito mais intenso de estressores do que os animais de Guarapiranga, embora em Aracati (Guarapiranga) foram obtidos os maiores valores

de compostos nitrogenados, bem como de CAF e DCF, do que nos outros pontos, sem reflexo nas respostas dos biomarcadores ao comparar com os outros pontos.

É importante ressaltar que era esperado que os animais da Pedreira (Billings) apresentassem alteração na maioria dos biomarcadores, pois esse ponto está diretamente exposto às descargas de água do rio Pinheiros, contendo uma grande carga poluidora da grande São Paulo, principalmente no verão que é a época de enchentes devido às chuvas. No entanto, os peixes de Bororé (Billings) também apresentaram importantes alterações fisiológicas quando comparados aos animais da Guarapiranga, apesar do mesmo grau de trofia no inverno e menor ainda no verão do que os pontos da Barragem e Aracati. Da mesma forma, uma alteração na atividade da CAT branquial no verão em Barragem sem possibilitar qualquer relação com a presença de contaminantes na água (dentre os avaliados no presente estudo) revelou a importância do uso de biomarcadores fisiológicos, principalmente quando não é viável medir a concentração de todos os xenobióticos na água. É importante ainda destacar a influência das estações (inverno-verão) nas atividades enzimáticas, assim como nos biomarcadores de danos celulares, reforçando novamente a dificuldade de extrapolar para o campo, um efeito observado no laboratório, de um poluente específico, uma vez que as variáveis ambientais que não são facilmente representadas no laboratório, podem ter uma grande influência na resposta dos organismos à contaminação.

Finalmente, nos três capítulos foi observado que nem sempre os biomarcadores de dano celular como a LPO e os de genotoxicidade são adequados para avaliar os efeitos dos poluentes, devido, em muitos casos, à ausência de evidência do dano. Sendo assim, uma ausência de dano celular evidente não deve ser interpretada como ausência de toxicidade do xenobiótico, pois os organismos têm uma alta capacidade para reparar estes danos, a menos que o grau de toxicidade esteja acima desta capacidade de reparo (Amiard-Triquet et al., 2013).

Este projeto faz parte de um projeto maior financiado pela FAPESP (Auxílio Regular, 2017/11530-1) dentro do qual outros dois projetos de mestrado complementam estes resultados. No capítulo 3, foram usadas fêmeas de *A. altiparanae*, pois outro projeto utilizou os machos para avaliar alguns biomarcadores

envolvidos no processo reprodutivo (Escalante-Rojas et al., 2021). No laboratório foram utilizados machos de *A. altiparanae* porque experiências prévias do nosso grupo de pesquisa vêm demonstrando que os machos são mais fáceis de manter e tem maior sobrevivência em condições de laboratório, devido a aspectos comportamentais. O experimento de exposição aguda foi realizado paralelamente a um projeto de mestrado, no qual foram avaliados biomarcadores reprodutivos dos animais expostos ao DCF e CAF, sendo os dados recentemente publicados (Godoi et al., 2020).

Por fim, as principais conclusões às que os resultados do presente projeto permitem chegar são:

1. O diclofenaco e a cafeína, em exposição aguda e subcrônica em laboratório, geram estresse oxidativo em machos adultos de *A. altiparanae*, mediante a inibição de enzimas do sistema antioxidante e/ou lipoperoxidação.
2. O diclofenaco e a cafeína apresentam efeitos neurotóxicos em machos adultos de *A. altiparanae* em exposições subcrônicas a concentrações ambientalmente relevantes.
3. O diclofenaco inibe a atividade da cicloxigenase em machos adultos de *A. altiparanae* em exposições subcrônicas a concentrações ambientalmente relevantes.
4. A cafeína apresenta efeitos genotóxicos em machos adultos de *A. altiparanae* em exposições subcrônicas a concentrações ambientalmente relevantes.
5. As fêmeas adultas de *A. altiparanae* presentes nos reservatórios Guarapiranga e Billings apresentam maior estresse oxidativo e genotoxicidade no inverno do que no verão.
6. As fêmeas adultas de *A. altiparanae* presentes no reservatório Billings evidenciam maiores alterações fisiológicas do que os peixes da Guarapiranga.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

- Almeida, G.A., Weber, R.R. 2005. Fármacos na represa Billings. *Revista Saúde e Ambiente* 6, 7-13.
- Alonso, M.B., de Carvalho, D.R., Alves, C.B.M., Moreira, M.Z., Pompeu, P.S. 2019. Changes in trophic characteristics of two fish species of *Astyanax* (Teleostei: Characidae) in response to aquatic pollution. *Zoologia* 36, 1–12.
- Amiard-Triquet, C., Jean-Claude, A., Rainbow, P.S. 2013. *Ecological Biomarkers Indicators of Ecotoxicological Effects*. CRC Press, U.S. 434 p.
- Atli, G., Canli, E.G., Eroglu, A., Canli, M. 2016. Characterization of antioxidant system parameters in four freshwater fish species. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 126, 30-37.
- Bertolucci, B., Vicentini, C.A., Vicentini, I.B.F., Bombonato, M.T.S. 2008. Light microscopy and ultrastructure of the liver of *Astyanax altiparanae* Garutti and Britski, 2000 (Teleostei, Characidae). *Acta Scientiarum. Biological Sciences* 30, 73–76.
- Beyer, J., Petersen, K., Song, Y., Ruus, A., Grung, M., Bakke, T., Tollefsen, K. E. 2014. Environmental risk assessment of combined effects in aquatic ecotoxicology: A discussion paper. *Marine Environmental Research* 96, 81-91.
- Bógus, L., Pasternak, S. 2019. Mapa social de la Región Metropolitana de São Paulo: desigualdades espaciales. *Andamios* 16 (39), 151-175.
- Braham, R.P., Blazer, V.S., Shaw, C.H., Mazik, P.M. 2017. Micronuclei and other erythrocyte nuclear abnormalities in fishes from the great lakes basin, USA. *Environmental and molecular mutagenesis* 58, 570-581.
- Calado, S.L.M., Andrade, M.C., Garrido, F., Pelanda, A., Lirolla, J., Salgado, L.D., Cestari, M.M., de Assis, H.C.S. 2019. Biochemical and genotoxicity assessment of a polluted urban river using the native fish *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski (Teleostei, Characidae). *Ecotoxicology and Environmental Contamination* 14 (1), 73-77.

- Cardoso-Silva, S., Nishimura, P.Y., Padial, P.R., Mariani, C.F., Moschini-Carlos, V., Pompêo, M.L.M. 2014. Compartmentalização e qualidade da água: o caso da Represa Billings. *Bioikos* 28 (1),31-43.
- Colin, N., Porte, C., Fernandes, D., Barata, C., Padrós, F., Carrassón, M., Monroy, M., Cano-Rocabayera, O., de Sosto, A., Piña, B., Maceda-Veiga, A. 2016. Ecological relevance of biomarkers in monitoring studies of macro-invertebrates and fish in Mediterranean rivers. *Science of the Total Environment* 540, 307–323.
- Escalante-Rojas, M.C., Tolussi, C.E., Gomes, A.D., Muñoz-Peñuela, M.M., Souza, G.B., Moreira, R.G. 2021. Integrated use of biomarkers to evaluate the reproductive physiology of *Astyanax fasciatus* and *Hoplias malabaricus* males (Teleostei: Characiformes) in polluted reservoirs. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 208, p. 111502.
- Flippin, J.L., Huggett, D., Foran, C.M. 2007. Changes in the timing of reproduction following chronic exposure to ibuprofen in Japanese medaka, *Oryzias latipes*. *Aquatic Toxicology* 81, 73–78.
- Francisco, C.M., Bertolino, S.M., de Oliveira Júnior, R.J., Morelli, S., Pereira, B.B. 2019. Genotoxicity assessment of polluted urban streams using a native fish *Astyanax altiparanae*. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* 82 (8), 514–523.
- Galindo, T.P., Moreira, L.M. 2009. Evaluation of genotoxicity using the micronucleus assay and nuclear abnormalities in the tropical sea fish *Bathygobius soporator* (Valenciennes, 1837) (Teleostei, Gobiidae). *Genetics and Molecular Biology* 32 (2), 394-398.
- Garutti, V., Britski, H.A., 2000. 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 e Tecnologia PUC Série Zoologia* 13, 65–88.
- Godoi, F.G.A., Muñoz-Peñuela, M., Gomes, A.D.O., Tolussi, C.E., Brambila-Souza, G., Branco, G.S., Lo Nostro, F.L., Moreira, R.G. 2020. Endocrine disruptive action of diclofenac and caffeine on *Astyanax altiparanae* males (Teleostei:

- Characiformes: Characidae). Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology 231, 108720.
- Guiloski I.C., Piancini, L.D.S., Dagostim, A.C., Calado, S.L.M., Fávoro, L.F., Boschen, S.L., Cestari, M.M., Cunha, C., Assis, H.C.S. 2017. Effects of Environmentally Relevant Concentrations of the Anti-Inflammatory Drug Diclofenac in Freshwater Fish *Rhamdia quelen*. Ecotoxicology and Environmental Safety 139, 291-300.
- Hermes-Lima, M., Willmore, W.G., Storey, K.B. 1995. Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe (III) xylenol orange complex formation. Free Radical Biology and Medicine 19 (3), 271-280.
- Hook, S.E., Gallagher, E.P. Batley, G.E. 2014. The Role of Biomarkers in the Assessment of Aquatic Ecosystem Health. Integrated Environmental Assessment and Management, 10 (3), 327–341.
- Huerta, B., Rodriguez-Mozaz, S., Nannoua, C., Nakis, L., Ruhí, A., Acuña, V., Sabater, S., Barcelo, D. 2016. Determination of a broad spectrum of pharmaceuticals and endocrine disruptors in biofilm from a waste water treatment plant-impacted river. Science of the Total Environment 540, 241–249.
- Kellar, C.R., Hassell, K.L., Long, S.M., Myers, J.H., Golding, L., Rose, G., Kumar, A., Hoffmann, A. A., Pettigrove, V. 2014. Ecological evidence links adverse biological effects to pesticide and metal contamination in an urban Australian watershed. Journal of Applied Ecology 51, 426–439.
- Livingstone, D.R. 2001. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. Marine Pollution Bulletin 42 (8), 656-666.
- López-Doval, J.C., Meirelles, S.T., Cardoso-Silva, S., Moschini-Carlos, V., Pompêo, M. 2016. Ecological and toxicological responses in a multistressor scenario: Are monitoring programs showing the stressors or just showing stress? A case study in Brazil. Science of the Total Environment 540, 466–476.
- Lucena, C., Soares, H.G. 2016. Review of species of the *Astyanax bimaculatus* “caudal peduncle spot” subgroup sensu Garutti & Langeani (Characiformes,



- Characidae) from the rio La Plata and rio São Francisco drainages and coastal systems of southern Brazil and Uruguay. *Zootaxa* 4072 (1), 101-125.
- Marceniuk, A.P., Hilsdorf, A.W.S. 2010. Peixes das cabeceiras do Rio Tietê e Parque das Neblinas. Ócsso Design, São Paulo, p. 160p.
- Marques, V.H., Moreira, R.G., Gomes, A.D. 2020. Influence of tropical reservoirs eutrophication on the polyunsaturated fatty acid profile in *Astyanax altiparanae* (Pisces: Characidae). *Science of The Total Environment* 717, 137-182.
- Matés, J.M. 2000. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology* 153, 83-104.
- Mezzelani, M., Gorbi, S., Regoli, F. 2018. Pharmaceuticals in the aquatic environments: Evidence of emerged threat and future challenges for marine organisms. *Marine Environmental Research* 140, 41–60.
- Montagner, C., Sodré, F., Acayaba, R., Vidal, C., Campestrini, I., Locatelli, M., Pescara, I., Albuquerque, A., Umbuzeiro, G., Jardim, W. 2019. Ten years-snapshot of the occurrence of emerging contaminants in drinking, surface and ground waters and wastewaters from São Paulo State, Brazil. *Journal of Brazilian Chemistry Society* 30, 614–632.
- Olivera, S., Rodríguez -Ithurralde, D., Henley, J.M. 2003. Acetylcholinesterase promotes neurite elongation, synapse formation and surface expression of AMPA receptors in hippocampal neurons. *Molecular and Cellular Neuroscience* 23(1), 96-106.
- PDUI (Plano de Desenvolvimento Urbano Integrado). 2016. Região Metropolitana de São Paulo, RMSP. Conselho de Desenvolvimento da Região Metropolitana de São Paulo. [https://www.pdui.sp.gov.br/rmsp/?page\\_id=56](https://www.pdui.sp.gov.br/rmsp/?page_id=56). Consultado: 14/08/2020.
- Pérez-Coyotl, I., Martínez-Vieyra, C., Galar-Martínez, M., Gómez-Oliván, L.M., García-Medina, S., Islas-Flores, H., Pérez-Pasten, R., Gasca-Pérez, E., Novoa-Luna, K.A., Dublán-García, O. 2017. DNA damage and cytotoxicity induced on common carp by pollutants in water from an urban reservoir. Madín reservoir, a case study. *Chemosphere* 185, 789-797.

- Pohanka, M., Dobeš, P. 2013. Caffeine Inhibits Acetylcholinesterase, but not butyrylcholinesterase. *International Journal of Molecular Sciences* 14, 9873-9882.
- Quadra, G.R., Souza, H.O., Costa, R.S., Fernandez, M.A.S. 2017. Do pharmaceuticals reach and affect the aquatic ecosystems in Brazil? A critical review of current studies in a developing country. *Environmental Science and Pollution Research* 24, 1200–1218.
- Rocco, L., Frenzilli, G., Fusco, D., Peluso, C., Stingo, V. 2011. Evaluation of zebrafish DNA integrity after exposure to pharmacological agents present in aquatic environments. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73, 1530-1536.
- Ruas, C.B.G., Carvalho, C.S., Araújo, H.S.S., Espíndola, E.L.G., Fernandes, M.N. 2008. Oxidative stress biomarkers of exposure in the blood of cichlid species from a metal-contaminated river. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 71, 86–93.
- Sauvé, S., Desrosiers, M. 2014. A review of what is an emerging contaminant. *Chemistry Central Journal* 8:15.
- Shihomatsu, H.M., Martins, E.A.J., Cotrim, M.E.B., Lebre, D.T., Ortiz, N., Pires, M.A.F. 2017. Guarapiranga Reservoir-Pharmaceuticals and Historical Urban Occupation in a Water Source. *Journal of Geoscience and Environmental Protection* 5, 1-17.
- Stepanova, S., Praskova, E., Chromcova, L., Pihalova, L., Prokes, M., Blahova, J., Svobodova, Z. 2013. The effects of diclofenac on early life stages of common carp (*Cyprinus carpio*). *Environmental Toxicology and Pharmacology* 35, 454-460.
- Storey, K.B. 1996. Oxidative Stress: animal adaptations in nature. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 29, 1715-1733.
- Tejada, C., Quiñonez, E., Peña, M. 2014. Contaminantes emergentes en águas: metabolitos de fármacos. Una revisión. *Revista Facultad de Ciencias Basicas* 10(1), 80-101.
- Taylor, P., Camp, S., Radić, Z. 2009. Acetylcholinesterase. *Encyclopedia of Neuroscience*, 5-7.
- Vieira, C.E.D., Costa, P.G., Cabrera, L.C., Primel, E.G., Fillmann, G., Bianchini, A., Martinez, C.B.R. 2017. A comparative approach using biomarkers in feral and

caged Neotropical fish: Implications for biomonitoring freshwater ecosystems in agricultural areas. *Science of the Total Environment* 586, 598–609.

# ANEXOS

## ANEXO 1. CARACTERÍSTICAS FÍSICAS E QUÍMICAS DO DICLOFENACO E DA CAFEÍNA

Os fármacos diclofenaco sódico (D6899) (pureza  $\geq 98\%$ ) e cafeína (C0750) (pureza  $\geq 98\%$ ) foram obtidos da Merck. As soluções foram preparadas utilizando os fármacos diluídos em água deionizada, segundo instruções do fabricante, com o auxílio de um agitador magnético.

O diclofenaco sódico é um anti-inflamatório não esteroide (NSAID) que age como um inibidor competitivo e irreversível da síntese da prostaglandina; e sua atividade analgésica e anti-inflamatória se baseia-se na prevenção da síntese dos metabólitos araquidônicos, via inibição da enzima ciclooxigenase (Sigma-Aldrich, 2019).

**Fórmula:**  $C_{14}H_{10}Cl_2NNaO_2$

**Sinônimo:** 2-[(2,6-Dichlorophenyl)amino]benzeneacetic acid sodium salt

**Peso molecular:**  $318.13 \text{ g mol}^{-1}$

**Solubilidade na água:**  $50 \text{ mg mL}^{-1}$

A cafeína é um estimulante do sistema nervoso central que age por meio dos receptores de adenosina e neurotransmissores monoaminos. É um antagonista dos receptores de adenosina e um inibidor da fosfodiesterase 3',5'-monofosfato cíclico (Sigma-Aldrich, 2019).

**Fórmula:**  $C_8H_{10}N_4O_2$

**Sinônimo:** 1,3,7-Trimethylxanthine

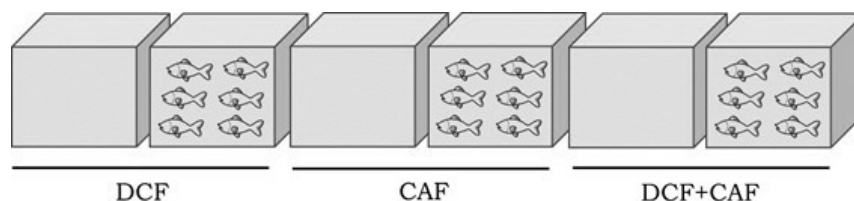
**Peso molecular:**  $194.19 \text{ g mol}^{-1}$

**Solubilidade na água:**  $15 \text{ mg mL}^{-1}$

## ANEXO 2. METODOLOGIA PRÉVIA AOS BIOENSAIOS DE TOXICIDADE AGUDA E SUBCRÔNICA

### Decaimento dos compostos DCF e CAF

Para definir a frequência de reposição de ambos os fármacos na água, foi realizado um teste de decaimento com três grupos experimentais (DCF, CAF e DCF + CAF). No teste, cada tratamento continha um aquário com peixes ( $n = 6$  em 60 litros de água) e um respectivo aquário sem os indivíduos, sendo que todos continham  $1 \text{ mg L}^{-1}$  do fármaco (Figura 1). Foram realizadas coletas de água no tempo 0, 12, 24 e 48 horas para quantificação dos compostos, sendo observado um decaimento de 2,76% após 48 horas para diclofenaco e de 5,82% para cafeína. Desta forma, foi decidido que as trocas de água seriam a cada 48 horas para reduzir o estresse nos animais.



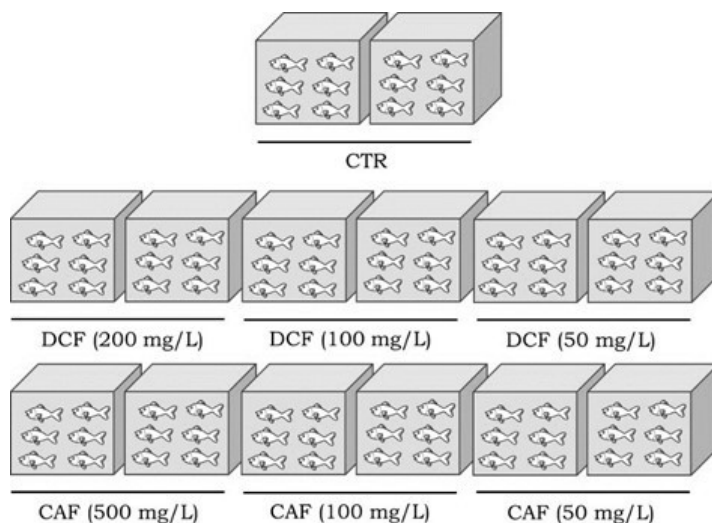
**Figura 1:** Teste de decaimento dos grupos diclofenaco (DCF), cafeína (CAF) e mistura (DCF + CAF) realizado no tempo de 48 horas com indivíduos machos da espécie *A. altiparanae*.

### Range Finding Test (RFT) e Teste de concentração letal média (CL<sub>50</sub>)

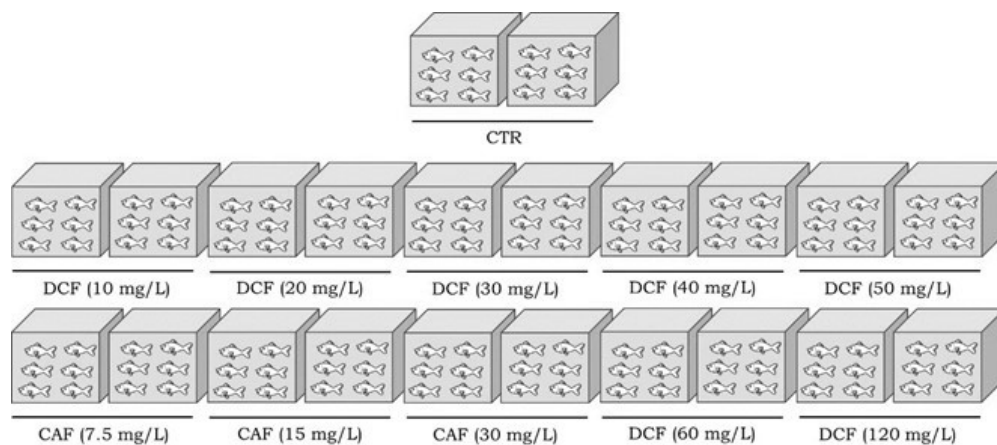
Adicionalmente, tendo em vista a falta de informações sobre quais as concentrações destes fármacos apresentariam risco para a espécie *A. altiparanae*, os testes de RFT e de concentração letal média (CL<sub>50</sub>) foram realizados. Primeiramente, no teste de RFT foram utilizados três grupos experimentais para cada fármaco, contendo 6 peixes por aquário em duplicata. As concentrações utilizadas foram: 200, 100 e 50  $\text{mg L}^{-1}$  para DCF e 500, 100 e 50  $\text{mg L}^{-1}$  para CAF por 96 h (Figura 2). Estes ensaios foram realizados com o objetivo de encontrar as concentrações a serem utilizadas no experimento para o cálculo da CL<sub>50</sub>.

Após os resultados obtidos no RFT foi realizado o teste CL<sub>50</sub> no tempo de 96 h. Com base na observação da mortalidade e sobrevivência dos indivíduos no RFT, a CL<sub>50</sub> foi conduzida com 5 concentrações diferentes para cada fármaco, além de um grupo controle, baseados nos dados encontrados na literatura e nos resultados do RFT, com um número amostral de 6 peixes por aquário em duplicata (Figura 3). O teste de CL<sub>50</sub> foi calculado usando o método Probit onde os valores foram transformados em uma curva logarítmica de dose-resposta

(mortalidade) (Finney, 1952). Para o DCF as concentrações utilizadas foram 10, 20, 30, 40 e 50 mg L<sup>-1</sup> e para a cafeína 7.5; 15; 30; 60 e 120 mg L<sup>-1</sup>.



**Figura 2:** Delineamento experimental do *Range Finding Test* (RFT) para diclofenaco (DCF) e cafeína (CAF) realizado no período de 96 horas com indivíduos machos da espécie *A. altiparanae*. CTR = controle.



**Figura 3:** Delineamento experimental do teste de concentração letal média (CL<sub>50</sub>) do diclofenaco (DCF) e cafeína (CAF) realizado no período de 96 horas com indivíduos machos da espécie *A. altiparanae*. CTR = controle.

**ANEXO 3. ANÁLISES E RESULTADOS DA CONCENTRAÇÃO DE FÁRMACOS: BIOENSAIO AGUDO**

| <b>CEMSA ID</b> | <b>Contratante ID</b> | <b>Amostra no paper</b>   |
|-----------------|-----------------------|---------------------------|
| 6253            | CAF1_12/02            | CAF Aquário 1 hora 0      |
| 6254            | CAF1_dia2_14/02       | CAF Aquário 1 hora 48     |
| 6255            | DCF1_12/02            | DCF Aquário 1 hora 0      |
| 6256            | DCF1_dia2_14/02       | DCF Aquário 1 hora 48     |
| 6257            | CTR1_12/02            | CTR Aquário 1 hora 0      |
| 6258            | CTR1_dia2_14/02       | CTR Aquário 1 hora 48     |
| 6259            | DCF+CAF1_12/02        | DCF+CAF Aquário 1 hora 0  |
| 6260            | DCF+CAF1_dia2_14/02   | DCF+CAF Aquário 1 hora 48 |
| 6261            | CAF2_12/02            | CAF Aquário 2 hora 0      |
| 6262            | CAF2_dia2_14/02       | CAF Aquário 2 hora 48     |
| 6263            | DCF2_12/02            | DCF Aquário 2 hora 0      |
| 6264            | DCF2_dia2_14/02       | DCF Aquário 2 hora 48     |
| 6265            | CTR2_12/02            | CTR Aquário 2 hora 0      |
| 6266            | CTR2_dia2_14/02       | CTR Aquário 2 hora 48     |
| 6267            | DCF+CAF2_12/02        | DCF+CAF Aquário 2 hora 0  |
| 6268            | CAF+DCF2_dia2_14/02   | DCF+CAF Aquário 2 hora 48 |



## RELATÓRIO/LAUDO DE ANÁLISE – Proposta nº M1211-0488

São Paulo, 23 de fevereiro de 2018.

**Contratante:** Departamento de Fisiologia – Instituto de Biociências

**Endereço:** Rua do Matão, travessa 14, nº 101 – salas 220/219B –  
Cidade Universitária.  
CEP: 05508-090 – São Paulo, SP Tel: (11) 3018-1050

**Interessada(o):** Dr. Carlos Arturo Nava Iannini / Dra. Renata G. Moreira

**Análise Solicitada:** Quantificação dos compostos: cafeína e diclofenaco em  
amostra aquosa proveniente de ensaio biológico.

**Laboratório Executor:** CEMSA – Centro de Espectrometria de Massas Aplicada  
Ltda.  
CIETEC/IPEN - Av. Prof. Lineu Prestes, 2242 CEP.  
05508-000, São Paulo, SP, Brasil  
Tel. (11) 3039-8358 Fax: (11) 3039-8420

### Cláusulas de Responsabilidade:

Os resultados reportados se referem somente ao material submetido ao ensaio.

Não se admite qualquer responsabilidade referente à exatidão da amostragem, a menos que esta tenha sido efetuada mediante nossa própria supervisão. Salvo menção expressa, as amostras foram livremente selecionadas pelo solicitante.

A reprodução deste relatório está autorizada em sua forma integral. A reprodução parcial só é permitida com a autorização expressa do CEMSA.

**Data de Recebimento das Amostras:** 20/02/2018  
**Amostras:** Água (proveniente de ensaio biológico)

**Total de Amostras Enviadas e Analisadas:** 16

| <b>CEMSA ID</b>                         | <b>Contratante ID</b> |
|-----------------------------------------|-----------------------|
| 6253                                    | CAF1_12/02            |
| 6254                                    | CAF1_dia2_14/02       |
| 6255                                    | DCF1_12/02            |
| 6256                                    | DCF1_dia2_14/02       |
| 6257                                    | CTR1_12/02            |
| 6258                                    | CTR1_dia2_14/02       |
| 6259                                    | DCF+CAF1_12/02        |
| 6260                                    | DCF+CAF1_dia2_14/02   |
| <b>Identificação (ID) das Amostras:</b> |                       |
| 6261                                    | CAF2_12/02            |
| 6262                                    | CAF2_dia2_14/02       |
| 6263                                    | DCF2_12/02            |
| 6264                                    | DCF2_dia2_14/02       |
| 6265                                    | CTR2_12/02            |
| 6266                                    | CTR2_dia2_14/02       |
| 6267                                    | DCF+CAF2_12/02        |
| 6268                                    | CAF+DCF2_dia2_14/02   |

**Interessado:** Dr. Carlos Arturo Nava Iannini **No da Proposta:** M1211-0488

Dra. Renata G. Moreira

**Nº páginas:** 03/11

---

## Resultados das Análises Quantitativas

**Analista:** Daniel Temponi Lebre, MSc.

**Técnica Analítica:** Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) acoplada a analisador de Espectrometria de Massas do tipo Triplo Quadrupolo (EM/EM)

| Amostra_ID do CEMSA      | Concentração de Cafeína (mg L <sup>-1</sup> ) | Concentração de Diclofenaco (mg L <sup>-1</sup> ) |
|--------------------------|-----------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| CAF1_12/02_6253          | 12.2                                          | < LOD                                             |
| CAF1_dia2_14/02_6254     | 9.82                                          | < LOD                                             |
| DCF1_12/02_6255          | < LOD                                         | 4.75                                              |
| DCF1_dia2_14/02_6256     | < LOD                                         | 4.73                                              |
| CTR1_12/02_6257          | < LOD                                         | < LOD                                             |
| CTR1_dia2_14/02_6258     | < LOD                                         | < LOD                                             |
| DCF+CAF1_12/02_6259      | 13.7                                          | 3.61                                              |
| DCF+CAF1_dia2_14/02_6260 | 10.8                                          | 3.90                                              |

**Data de Realização das Análises:** 21/02/2018

**MSc. Daniel Temponi Lebre - CRQ: 04146260**  
Diretor Técnico – Científico

**Interessado:** Dr. Carlos Arturo Nava Iannini **Nº da Proposta:** M1211-0488

Dra. Renata G. Moreira

**Nº páginas:** 04/11

---

### Resultados das Análises Quantitativas

**Analista:** Daniel Temponi Lebre, MSc.

**Técnica Analítica:** Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) acoplada a analisador de Espectrometria de Massas do tipo Triplo Quadrupolo (EM/EM)

| Amostra_ID do CEMSA      | Concentração Cafeína (mg L <sup>-1</sup> ) | Concentração Diclofenaco (mg L <sup>-1</sup> ) |
|--------------------------|--------------------------------------------|------------------------------------------------|
| CAF2_12/02_6261          | 13.3                                       | < LOD                                          |
| CAF2_dia2_14/02_6262     | 11.2                                       | < LOD                                          |
| DCF2_12/02_6263          | < LOD                                      | 3.94                                           |
| DCF2_dia2_14/02_6264     | < LOD                                      | 3.96                                           |
| CTR2_12/02_6265          | < LOD                                      | < LOD                                          |
| CTR2_dia2_14/02_6266     | < LOD                                      | < LOD                                          |
| DCF+CAF2_12/02_6267      | 13.0                                       | 4.01                                           |
| CAF+DCF2_dia2_14/02_6268 | 11.4                                       | 4.41                                           |

**Data de Realização das Análises:** 21/02/2018.

Limite de Detecção Cafeína (LOD): 1,5 µg L<sup>-1</sup>

Limite de Quantificação Cafeína (LOQ): 5,1 µg L<sup>-1</sup>

Limite de Detecção Diclofenaco (LOD): 0,054 µg L<sup>-1</sup>

Limite de Quantificação Diclofenaco (LOQ): 0,18 µg L<sup>-1</sup>



**MSc. Daniel Temponi Lebre - CRQ: 04146260**  
Diretor Técnico – Científico

## 1. Informações Gerais da Análise

### 1.1. Instrumentação Analítica

TABELA 1. Equipamento de CLAE-EM/EM.

| Equipamentos                          | Modelo              | Marca                |
|---------------------------------------|---------------------|----------------------|
| CLAE (Bomba binária, desgaseificador) | Agilent 1260 series | Agilent Technologies |
| Injetor automático                    | Agilent 1260series  | Agilent Technologies |
| Espectrômetro de Massas (EM/EM)       | Agilent 1260series  | Sciex                |
| Fonte                                 | 3200 QTRAP          | Sciex                |
| Programa de Aquisição de Dados        | Analyst 1.5.2       | Sciex                |

### 1.2. Reagentes

TABELA 2. Reagentes utilizados.

| Reagentes                   | Marca          | Especificação |
|-----------------------------|----------------|---------------|
| Acetonitrila                | J.T.Baker      | Grau CLAE     |
| Água                        | Millipore      | 18,2 mΩ       |
| Ácido Fórmico               | Sigma- Aldrich | Grau CLAE-EM  |
| Diclofenaco (CEMSA ID 5848) | Sigma- Aldrich | 93484-100     |
| Cafeína                     | Sigma- Aldrich | C0750-100     |

### 1.3. Materiais e Equipamentos Periféricos

TABELA 3. Materiais e equipamentos periféricos.

| Material                       | Especificação           |
|--------------------------------|-------------------------|
| Pipeta Automática              | 20-200 µL / 100-1000 µL |
| Microtubo plástico (Eppendorf) | 1,5 a 2 mL              |
| Balança Analítica (Shimadzu)   | Min 1 mg                |

#### 1.4. Metodologia desenvolvida para análise por CLAE-EM/EM

##### 1.4.1. Condições da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

TABELA 4. Condições de Separação Cromatográfica.

| Parâmetro         | Condição utilizada                                                             |
|-------------------|--------------------------------------------------------------------------------|
| Coluna            | Luna C18 HST (2) (100 x 2,0 mm; 2,5µm)<br>(Phenomenex)<br>Temp. coluna: 35C    |
| Fase móvel        | A: água ultrapura + 0.1% ácido fórmico<br>B: Acetonitrila + 0.1% ácido fórmico |
| Fluxo             | 220 µL.min <sup>-1</sup>                                                       |
| Volume de injeção | 5 µL                                                                           |
| Tempo de corrida  | 6,5 minutos                                                                    |

TABELA 5. Gradiente de Eluição.

| Tempo (minutos)   | A (%) | B(%) |
|-------------------|-------|------|
| 2,30 (equilíbrio) | 80    | 20   |
| 0,30              | 80    | 20   |
| 0,31              | 10    | 90   |
| 4,00              | 10    | 90   |
| 4,01              | 80    | 20   |
| 6,50              | 80    | 20   |

Tempo de Retenção Cafeína: 1,62 minutos.

Tempo de Retenção Diclofenaco: 5,86 minutos.

#### 1.4.2. Condições do espectrômetro de massas

TABELA 6. Parâmetros da Fonte de íons

| Parâmetros – Modo Positivo | Valores |
|----------------------------|---------|
| Curtain Gas                | 15      |
| ElectroSpray Voltage       | 5200    |
| Source Temp.               | 350 °C  |
| Gas 1 (nebulizer)          | 45 u.a. |
| Gas 2 (heater gas)         | 50 u.a. |
| CAD (Collision Gas)        | Medium  |

\*u.a. = unidades arbitrárias.

#### 1.4.3. Analisador EM/EM (modo Multiple Reaction Monitoring):

TABELA 7. Parâmetros do Analisador de Massas

| Compostos               | Q1 (m/z)     | Q3 (m/z)     | Dwell time (msec) | DP (V) | EP (V) | CEP (V) | CE (eV) | CXP (V) |
|-------------------------|--------------|--------------|-------------------|--------|--------|---------|---------|---------|
| <b>Cafeína</b>          | <b>195,1</b> | 110,1        | 200               |        |        |         | 27      | 2       |
|                         |              | <b>138,1</b> | 200               | 48     | 7      | 15      | 22      | 2       |
| <b>Diclofenac<br/>o</b> | <b>296,1</b> | <b>214,1</b> | 200               |        |        |         | 39      | 4       |
|                         |              | 250,0        | 200               | 21     | 6,5    | 14      | 19      | 4       |

\*Valores em negrito: Transição utilizada para a quantificação dos compostos analisados.

## 2. Preparo dos padrões analíticos e amostra

### 2.1. Preparo dos Padrões Analítico

#### 2.1.1. Solução Padrão Estoque da Cafeína (SEC)

Pesou-se 1,00 mg do padrão de cafeína (Sigma Aldrich - C0750-100) em microtubo de 1,5 mL. Adicionou-se 1,00 mL de sol. 50%ACN/50% H<sub>2</sub>O (v/v) e homogeneizou-se em vortex por 30 segundos. Armazenamento em geladeira 3 °C.

**Concentração de diclofenaco: 1,00 mg mL<sup>-1</sup> (1000 µg mL<sup>-1</sup>).**

#### 2.1.4. Solução Padrão Estoque do Diclofenaco (SED)

Pesou-se 1,00 mg do padrão de diclofenaco (CEMSA ID: 5848) em microtubo de 1,5 mL. Adicionou-se 1,00 mL de sol. 50%ACN/50% H<sub>2</sub>O (v/v) e homogeneizou-se em vortex por 30 segundos. Armazenamento em geladeira 3 °C.

**Concentração de diclofenaco: 1,00 mg mL<sup>-1</sup> (1000 µg mL<sup>-1</sup>).**

**OBS.:** foi realizada a correção da pesagem da massa, devido ao padrão diclofenaco de sódio.

#### 2.1.5. Solução Padrão Intermediária de da Cafeína e Diclofenaco (SICD-I)

Em microtubo de 1,5 mL procedeu-se a diluição das soluções padrão, utilizando uma solução de 50%ACN/50% H<sub>2</sub>O (v/v). Para 1 mL, dilui-se 100µL da solução estoque SEC e 100µL da solução estoque SED para 800 µL da solução de diluição. Armazenamento em geladeira 3 °C.

**Concentração final de cafeína e diclofenaco: 100 µg mL<sup>-1</sup>.**

### 2.2. Preparo das Amostras

As amostras foram ambientadas, aliqüotadas e injetadas diretamente no sistema CLAE-EM/EM.



### 3. Curva Analítica

#### 3.1. Preparo Curva Analítica

A curva analítica foi preparada para os padrões diclofenaco e cafeína nas seguintes concentrações, informada na tabela 8.

TABELA 8. Curva Analítica dos padrões Diclofenaco e Cafeína.

| Ponto | Concentração de Cafeína e Diclofenaco (mg L <sup>-1</sup> ) | Diluição em H <sub>2</sub> O (vol final 250 µL) |
|-------|-------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| P1    | 0,625                                                       | 1:1 P2                                          |
| P2    | 1,25                                                        | 1:1 P3                                          |
| P3    | 2,5                                                         | 1:1 P4                                          |
| P4    | 5,0                                                         | 1:1 P5                                          |
| P5    | 10                                                          | 25 µL de SICD-I + 225 µL H <sub>2</sub> O       |

#### 3.2. Curva Analítica da Cafeína

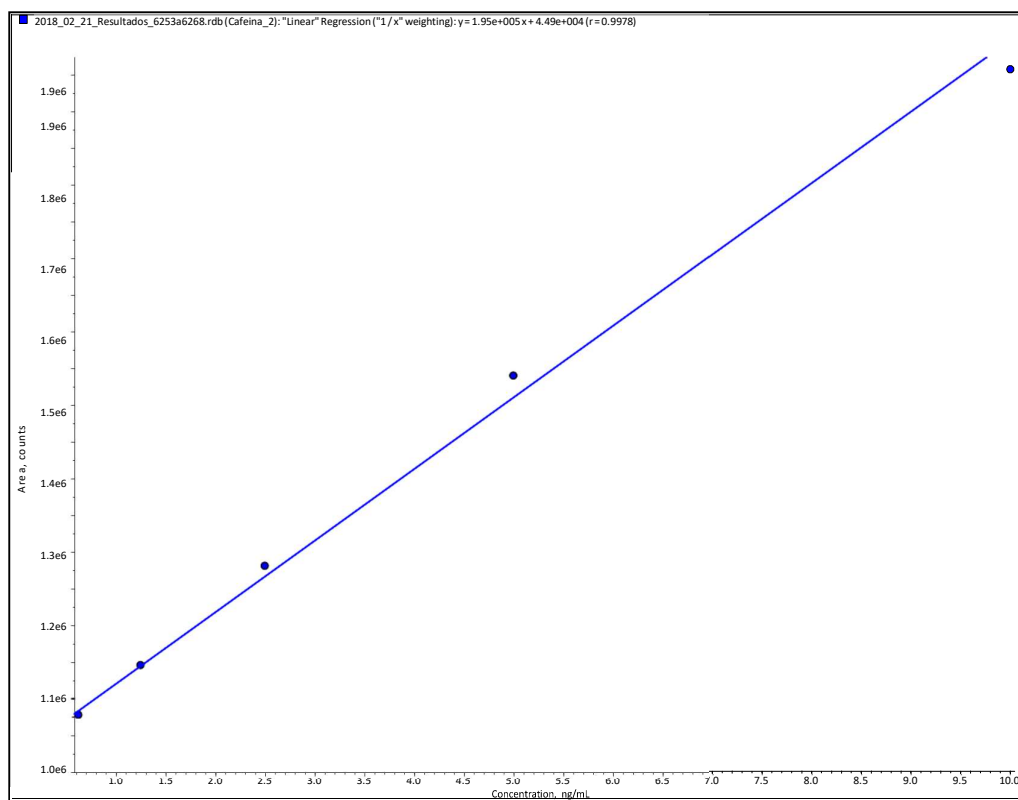


FIGURA 1. Curva Analítica da Cafeína.

#### Dados:

$$y = ax + b \text{ (fator } 1/x)$$

$$y = 1,95 \times 10^5 x + 4,49 \times 10^4$$

$$r \text{ (coeficiente de linearidade)} = 0,9978$$

### 3.3. Curva Analítica do Diclofenaco

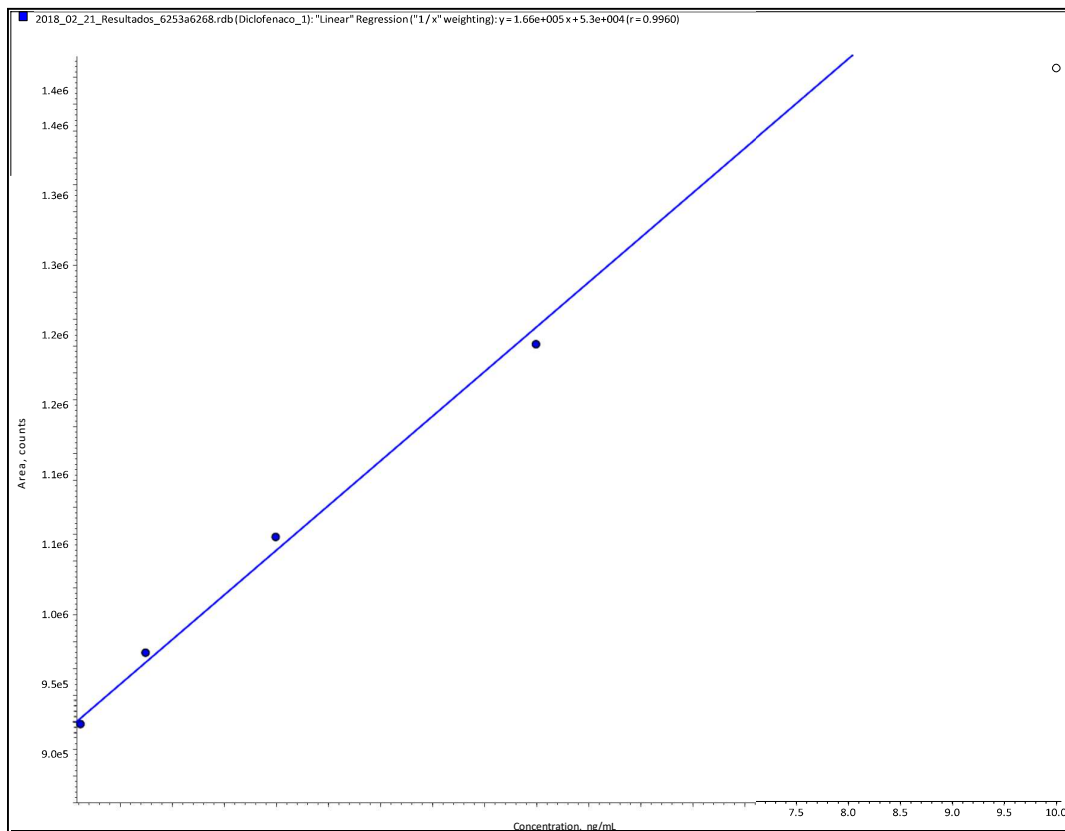


FIGURA 2. Curva Analítica do Diclofenaco.

#### Dados:

$y = ax + b$  (fator  $1/x$ )  
 $y = 1,66 \times 10^5 x + 5,3 \times 10^4$   
 $r$  (coeficiente de linearidade) = 0,9960  
(ponto P5 foi retirado da curva analítica)

#### 4. Exemplo de Cromatograma.

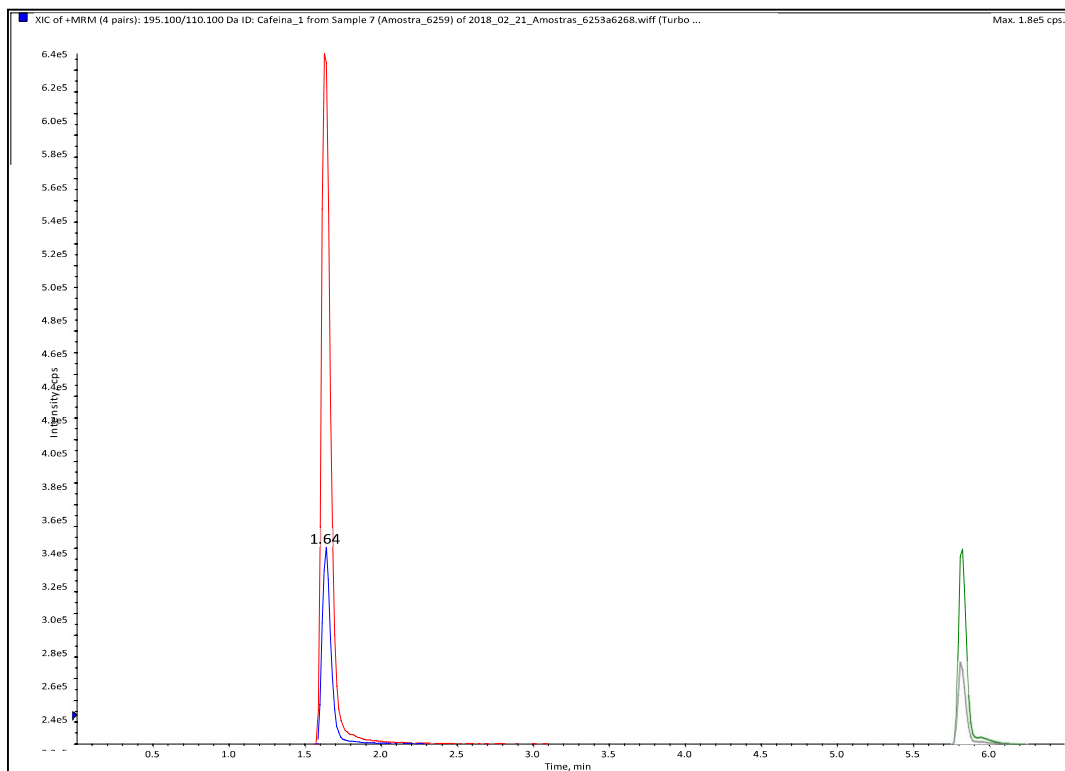


FIGURA 3. Cromatograma (XIC – “Extract Ion Chromatogram”) análise da amostra DCF+CAF1\_12/02 (ID 6259). Cafeína (Traço Vermelho MRM 195>138/ Traço Azul MRM 195>110). Diclofenaco (Traço Verde MRM 296>214 e Traço Cinza 296>250).

**ANEXO 4. ANÁLISES E RESULTADOS DA CONCENTRAÇÃO DE FÁRMACOS: BIOENSAIO SUBCRÔNICO**

| <b>CEMSA ID</b> | <b>Contratante ID</b> | <b>Amostra no paper</b>   |
|-----------------|-----------------------|---------------------------|
| 7918            | Amostra Controle 1    | CTR Aquário 1 hora 0      |
| 7919            | Amostra Controle 2    | CTR Aquário 2 hora 0      |
| 7920            | Amostra Cafeína 3     | CAF Aquário 1 hora 0      |
| 7921            | Amostra Cafeína 4     | CAF Aquário 2 hora 0      |
| 7922            | Amostra Diclofenaco 5 | DCF Aquário 1 hora 0      |
| 7923            | Amostra Diclofenaco 6 | DCF Aquário 2 hora 0      |
| 7924            | Amostra Mistura 7     | DCF+CAF Aquário 1 hora 0  |
| 7925            | Amostra Mistura 8     | DCF+CAF Aquário 2 hora 0  |
| 8034            | Amostra Controle 1    | CTR Aquário 1 hora 48     |
| 8035            | Amostra Controle 2    | CTR Aquário 2 hora 48     |
| 8036            | Amostra Cafeína 1     | CAF Aquário 1 hora 48     |
| 8037            | Amostra Cafeína 2     | CAF Aquário 2 hora 48     |
| 8038            | Amostra Diclofenaco 1 | DCF Aquário 1 hora 48     |
| 8039            | Amostra Diclofenaco 2 | DCF Aquário 2 hora 48     |
| 8040            | Amostra Mistura 1     | DCF+CAF Aquário 1 hora 48 |
| 8041            | Amostra Mistura 2     | DCF+CAF Aquário 2 hora 48 |

## RELATÓRIO/LAUDO DE ANÁLISE – Proposta nº M1211-0553

São Paulo, 22 de fevereiro de 2019.

**Contratante:** Departamento de Fisiologia – Instituto de Biociências

**Endereço:** Rua do Matão, travessa 14, nº 101 – salas 220/219B –  
Cidade Universitária.  
CEP: 05508-090 – São Paulo, SP Tel: (11) 3018-1050

**Interessada(o):** Dr. Carlos Arturo Nava Iannini / Dra. Renata G. Moreira

**Análise Solicitada:** Quantificação dos compostos: cafeína e diclofenaco em  
amostra aquosa proveniente de ensaio biológico.

**Laboratório Executor:** CEMSA – Centro de Espectrometria de Massas  
Aplicada Ltda.  
CIETEC/IPEN - Av. Prof. Lineu Prestes, 2242  
CEP. 05508-000, São Paulo, SP, Brasil  
Tel. (11) 3039-8358 Fax: (11) 3039-8420

### Cláusulas de Responsabilidade:

Os resultados reportados se referem somente ao material submetido ao ensaio.

Não se admite qualquer responsabilidade referente à exatidão da amostragem, a menos que esta tenha sido efetuada mediante nossa própria supervisão. Salvo menção expressa, as amostras foram livremente selecionadas pelo solicitante.

A reprodução deste relatório está autorizada em sua forma integral. A reprodução parcial só é permitida com a autorização expressa do CEMSA.

|                                                 |                   |                                        |
|-------------------------------------------------|-------------------|----------------------------------------|
| <b>Data de Recebimento das Amostras:</b>        |                   | 12/02/2018                             |
| <b>Amostras:</b>                                |                   | Água (proveniente de ensaio biológico) |
| <b>Total de Amostras Enviadas e Analisadas:</b> |                   | 08                                     |
| <b>Identificação (ID) das Amostras:</b>         | <b>CEMSA ID</b>   | <b>Contratante ID</b>                  |
|                                                 | 7918              | Amostra Controle 1                     |
|                                                 | 7919              | Amostra Controle 2                     |
|                                                 | 7920              | Amostra Cafeína 3                      |
|                                                 | 7921              | Amostra Cafeína 4                      |
|                                                 | 7922              | Amostra Diclofenaco 5                  |
|                                                 | 7923              | Amostra Diclofenaco 6                  |
|                                                 | 7924              | Amostra Mistura 7                      |
| 7925                                            | Amostra Mistura 8 |                                        |

**Interessado:** Dr. Carlos Arturo Nava Iannini    **No da Proposta:** M1211-0553  
Dra. Renata G. Moreira

## Resultados das Análises Quantitativas

**Analista:** Daniel Temponi Lebre, MSc.

**Técnica Analítica:** Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) acoplada a analisador de Espectrometria de Massas do tipo Triplo Quadrupolo (EM/EM)

| Amostra_ID do CEMSA        | Concentração de Cafeína ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) | Concentração de Diclofenaco ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) |
|----------------------------|--------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| Amostra Controle 1_7918    | <LOD                                             | <LOQ                                                 |
| Amostra Controle 2_7919    | <LOD                                             | <LOQ                                                 |
| Amostra Cafeína 3_7920     | 24,9                                             | <LOQ                                                 |
| Amostra Cafeína 4_7921     | 27,3                                             | <LOQ                                                 |
| Amostra Diclofenaco 5_7922 | <LOD                                             | 0,557                                                |
| Amostra Diclofenaco 6_7923 | <LOD                                             | 0,622                                                |
| Amostra Mistura 7_7924     | 24,3                                             | 0,474                                                |
| Amostra Mistura 8_7925     | 24,2                                             | 0,468                                                |

**Data de Realização das Análises:** 12/02/2019 (Cafeína) e 22/02/2019 (Diclofenaco)

**Data de Realização das Análises:** 21/02/2018.

Limite de Detecção Cafeína (LOD):  $1,5 \mu\text{g L}^{-1}$

Limite de Quantificação Cafeína (LOQ):  $5,1 \mu\text{g L}^{-1}$

Limite de Detecção Diclofenaco (LOD):  $0,004 \mu\text{g L}^{-1}$

Limite de Quantificação Diclofenaco (LOQ):  $0,014 \mu\text{g L}^{-1}$

**MSc. Daniel Temponi Lebre - CRQ: 04146260**  
Diretor Técnico – Científico

## 1. Informações Gerais da Análise

### 1.1. Instrumentação Analítica

TABELA 1. Equipamento de CLAE-EM/EM.

| Equipamentos                          | Modelo              | Marca                |
|---------------------------------------|---------------------|----------------------|
| CLAE (Bomba binária, desgaseificador) | Agilent 1260 series | Agilent Technologies |
| Injetor automático                    | Agilent 1260series  | Agilent Technologies |
| Espectrômetro de Massas (EM/EM)       | Agilent 1260series  | Sciex                |
| Fonte                                 | 3200 QTRAP          | Sciex                |
| Programa de Aquisição de Dados        | Analyst 1.5.2       | Sciex                |

### 1.2. Reagentes

TABELA 2. Reagentes utilizados.

| Reagentes                   | Marca          | Especificação |
|-----------------------------|----------------|---------------|
| Acetonitrila                | J.T.Baker      | Grau CLAE     |
| Água                        | Millipore      | 18,2 mΩ       |
| Ácido Fórmico               | Sigma- Aldrich | Grau CLAE-EM  |
| Acetato de Etila            | Macron         | Grau PA-ASC   |
| Diclofenaco (CEMSA ID 5848) | Sigma- Aldrich | 93484-100     |
| Cafeína                     | Sigma- Aldrich | C0750-100     |

### 1.3. Materiais e Equipamentos Periféricos

TABELA 3. Materiais e equipamentos periféricos.

| Material                       | Especificação           |
|--------------------------------|-------------------------|
| Pipeta Automática              | 20-200 µL / 100-1000 µL |
| Microtubo plástico (Eppendorf) | 1,5 a 2 mL              |
| Balança Analítica (Shimadzu)   | Min 1 mg                |



## 1.4. Metodologia desenvolvida para análise por CLAE-EM/EM

### 1.4.1. Condições da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

TABELA 4. Condições de Separação Cromatográfica.

| Parâmetro         | Condição utilizada                                                                |
|-------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| Coluna            | Luna C18 HST (2) (100 x 2,0 mm; 2,5 $\mu$ m)<br>(Phenomenex)<br>Temp. coluna: 35C |
| Fase móvel        | A: água ultrapura + 0.1% ácido fórmico<br>B: Acetonitrila + 0.1% ácido fórmico    |
| Fluxo             | 220 $\mu$ L.min <sup>-1</sup>                                                     |
| Volume de injeção | 5 $\mu$ L (10 $\mu$ L – Diclofenaco)                                              |
| Tempo de corrida  | 6,5 minutos (Cafeína) e 8.50 (Diclofenaco)                                        |

TABELA 5. Gradiente de Eluição.

| Tempo (minutos)   | A (%) | B(%) |
|-------------------|-------|------|
| 2,30 (equilíbrio) | 80    | 20   |
| 0,30              | 80    | 20   |
| 0,31              | 10    | 90   |
| 4,00              | 10    | 90   |
| 4,01              | 80    | 20   |
| 6,50              | 80    | 20   |

Tempo de Retenção Cafeína: 2,00 minutos.

Tempo de Retenção Diclofenaco: 7,50 minutos.

### 1.4.2. Condições do espectrômetro de massas

TABELA 6. Parâmetros da Fonte de íons

| Parâmetros – Modo Positivo | Valores |
|----------------------------|---------|
| Curtain Gas                | 15      |
| ElectroSpray Voltage       | 5200    |
| Source Temp.               | 350 °C  |
| Gas 1 (nebulizer)          | 45 u.a. |
| Gas 2 (heater gas)         | 50 u.a. |
| CAD (Collision Gas)        | Medium  |

\*u.a. = unidades arbitrárias.

### 1.4.3. Analisador EM/EM (modo Multiple Reaction Monitoring):

TABELA 7. Parâmetros do Analisador de Massas

| Compostos          | Q1<br>(m/z)  | Q3<br>(m/z)  | Dwell time<br>(msec) | DP (V) | EP (V) | CEP (V) | CE (eV) | CXP (V) |
|--------------------|--------------|--------------|----------------------|--------|--------|---------|---------|---------|
| <b>Cafeína</b>     | <b>195,1</b> | 110,1        | 200                  |        |        |         | 27      | 2       |
|                    |              | <b>138,1</b> | 200                  | 48     | 7      | 15      | 22      | 2       |
|                    |              | <b>214,1</b> | 200                  |        |        |         | 39      | 4       |
| <b>Diclofenaco</b> | <b>296,1</b> | 250,0        | 200                  | 21     | 6,5    | 14      | 19      | 4       |

\*Valores em negrito: Transição utilizada para a quantificação dos compostos analisados.

## 2. Preparo dos padrões analíticos e amostra

### 2.1. Preparo dos Padrões Analítico

#### 2.1.1. Solução Padrão Estoque da Cafeína (SEC)

Pesou-se 1,64mg do padrão de cafeína (Sigma Aldrich - C0750-100) em microtubo de 1,5 mL. Adicionou-se 1,64 mL de sol. 50%ACN/50% H<sub>2</sub>O (v/v) e homogeneizou-se em vortex por 30 segundos. Armazenamento em geladeira 8°C.

**Concentração de diclofenaco: 1,00 mg mL<sup>-1</sup> (1000 µg mL<sup>-1</sup>).**

#### 2.1.2. Solução Padrão Intermediária de Cafeína (SIC-I 100)

Em microtubo de 1,5 mL procedeu-se a diluição das soluções padrão, utilizando uma solução de 50%ACN/50% H<sub>2</sub>O (v/v). Para 1 mL, dilui-se 100 µL da solução estoque SEC para 900 µL da solução de diluição. Armazenamento em geladeira 3°C.

**Concentração final de cafeína: 100 µg mL<sup>-1</sup>.**

#### 2.1.3. Solução Padrão Intermediária de Cafeína (SIC-I 10)

Em microtubo de 1,5 mL procedeu-se a diluição das soluções padrão, utilizando uma solução de 50%ACN/50% H<sub>2</sub>O (v/v). Para 1 mL, dilui-se 100 µL da sol. SIC-I 100 para 900 µL da solução de diluição. Armazenamento em geladeira 3°C.

**Concentração final de cafeína: 10 µg mL<sup>-1</sup>.**

#### 2.1.4. Solução Padrão Intermediária de Cafeína (SIC-T)

Em microtubo de 1,5 mL procedeu-se a diluição das soluções padrão, utilizando uma solução de H<sub>2</sub>O. Para 1 mL, dilui-se 16 µL da sol. SIC-I 10 para 984 µL de H<sub>2</sub>O. Armazenamento em geladeira 3°C.

**Concentração final de cafeína: 0.16 µg mL<sup>-1</sup>.**

#### 2.1.5. Solução Padrão Estoque do Diclofenaco (SED)

Pesou-se 1,90 mg do padrão de diclofenaco de sódio) (CEMSA ID: 5848) (1,77 mg diclofenaco em microtubo de 1,5 mL. Adicionou-se 1,77 mL de sol. 50%ACN/50% H<sub>2</sub>O (v/v) e homogeneizou-se em vortex por 30 segundos. Armazenamento em geladeira 8°C.

**Concentração de diclofenaco: 1,00 mg mL<sup>-1</sup> (1000 µg mL<sup>-1</sup>).**

**OBS.:** foi realizada a correção da pesagem da massa, devido ao padrão diclofenaco de sódio.

#### 2.1.6. Solução Padrão Intermediária de Diclofenaco (SID-I 100)

Em microtubo de 1,5 mL procedeu-se a diluição das soluções padrão, utilizando uma solução de 50%ACN/50% H<sub>2</sub>O (v/v). Para 1 mL, dilui-se 100 µL da solução estoque SED para 900 µL da solução de diluição. Armazenamento em geladeira 3°C.

**Concentração final de cafeína: 100 µg mL<sup>-1</sup>.**

#### 2.1.7. Solução Padrão Intermediária de Diclofenaco (SID-I 10)

Em microtubo de 1,5 mL procedeu-se a diluição das soluções padrão, utilizando uma solução de 50%ACN/50% H<sub>2</sub>O (v/v). Para 1 mL, dilui-se 100 µL da sol. SID-I 100 para 900 µL da solução de diluição. Armazenamento em geladeira 3°C.

**Concentração final de cafeína: 10 µg mL<sup>-1</sup>.**

#### 2.1.4 Solução Padrão Intermediária de Diclofenaco (SID-T)

Em microtubo de 1,5 mL procedeu-se a diluição das soluções padrão, utilizando uma solução de H<sub>2</sub>O. Para 1 mL, dilui-se 16 µL da sol. SID-I 10 para 984 µL de H<sub>2</sub>O. Armazenamento em geladeira 3°C.

**Concentração final de cafeína: 0.16 µg mL<sup>-1</sup>.**

## **2.2. Preparo das Amostras para a Análise de Cafeína**

As amostras foram ambientadas, aliquotadas e injetadas diretamente no sistema CLAE-EM/EM.

## **2.2 Preparo das Amostras para a Análise de Diclofenaco**

- Extração Líquido- Líquido (LLE) para concentração da amostra e preparo da curva analítica.
- Em tubo de ensaio de vidro de 14 mL adicionar 2,0 mL de amostra (ou curva analítica preparada em água)
- Adicionar 2,0 mL de acetato de etila. Agitar em vortex por 30 segundos. Centrifugar à 2000 pm.
- Retirar aproximadamente 1800 uL da fase orgânica e transferir para um tubo de ensaio de vidro de 7,0 mL.
- Secar a fase orgânica sob fluxo de ar à 40°C.
- Dissolver o resíduo com 180 uL de solução 80% $H_2O$ /20% ACN (v/v). Agitar em vortex por 10 segundos
- Transferir para um poço na placa de 96 ou em vial.
- Injetar no sistema de CLAE-EM/EM.

### 3. Curva Analítica

#### 3.1. Preparo Curva Analítica

A curva analítica foi preparada para cafeína nas seguintes concentrações, informada na tabela 8.

TABELA 8. Curva Analítica Cafeína (em H<sub>2</sub>O).

| Ponto | Concentração de Cafeína<br>( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) ou ( $\text{ng mL}^{-1}$ ) | Diluição em H <sub>2</sub> O (vol final 250 $\mu\text{L}$ ) |
|-------|--------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| P1    | 5                                                                              | 1:1 P1                                                      |
| P2    | 10                                                                             | 1:1 P3                                                      |
| P3    | 20                                                                             | 1:1 P4                                                      |
| P4    | 40                                                                             | 1:1 P5                                                      |
| P5    | 80                                                                             | 1:1 P6                                                      |
| P6    | 160                                                                            | SIC-T                                                       |

P0 – 100% H<sub>2</sub>O (Branco)

#### Curva Analítica da Cafeína

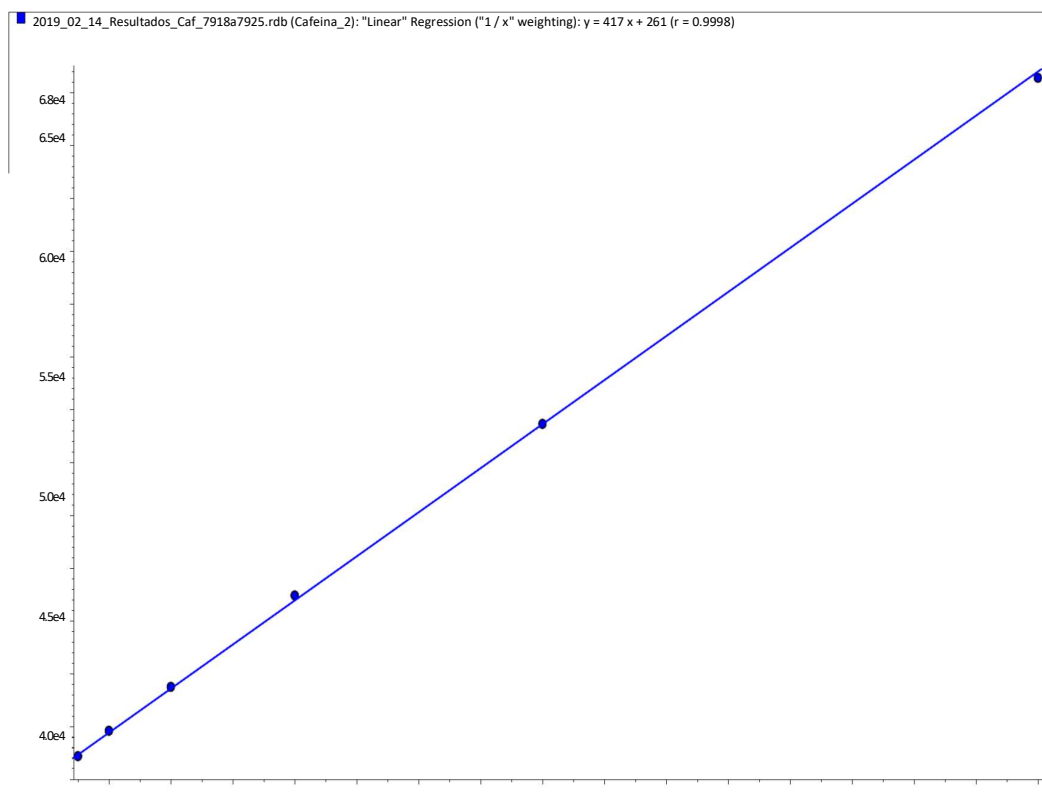


FIGURA 1. Curva Analítica da Cafeína.

#### Dados:

$$y = ax + b \text{ (fator } 1/x)$$

$$y = 417x + 261$$

$$r \text{ (coeficiente de linearidade)} = 0,9998$$

### 3.2. Curva Analítica do Diclofenaco

A curva analítica foi preparada nas seguintes concentrações, informada na tabela 9.

TABELA 9. Curva Analítica Diclofenaco (em H<sub>2</sub>O).

| Ponto | Concentração de Cafeína<br>(ug L <sup>-1</sup> ) ou (ng mL <sup>-1</sup> ) | Diluição em H <sub>2</sub> O (vol final 8.0 MI) |
|-------|----------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| P1    | 0.10                                                                       | 1:1 P1                                          |
| P2    | 0.20                                                                       | 1:1 P3                                          |
| P3    | 0.40                                                                       | 1:1 P4                                          |
| P4    | 0.80                                                                       | 1:1 P5                                          |
| P5    | 1.60                                                                       | 80 UI de SID-T em 7.92 MI de H <sub>2</sub> O   |

P0 – 100% H<sub>2</sub>O (Branco). Após o preparo as soluções da curva foram submetidas a extração LLE.

### Curva Analítica do Diclofenaco

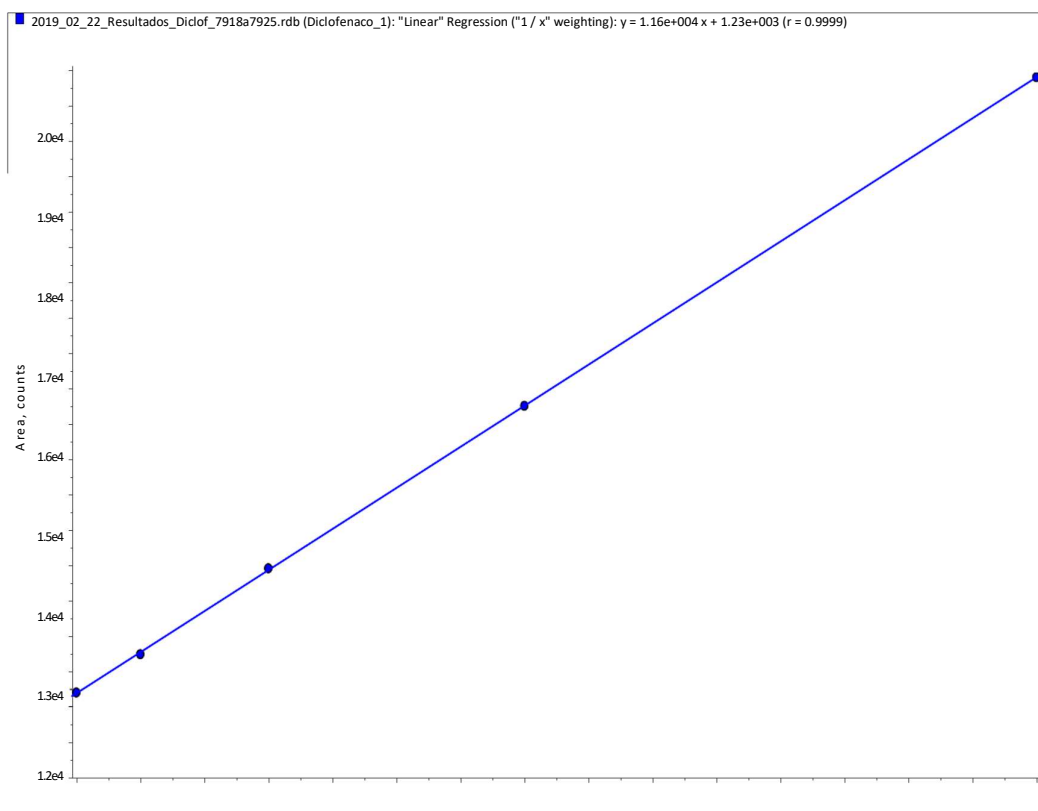


FIGURA 2. Curva Analítica do Diclofenaco.

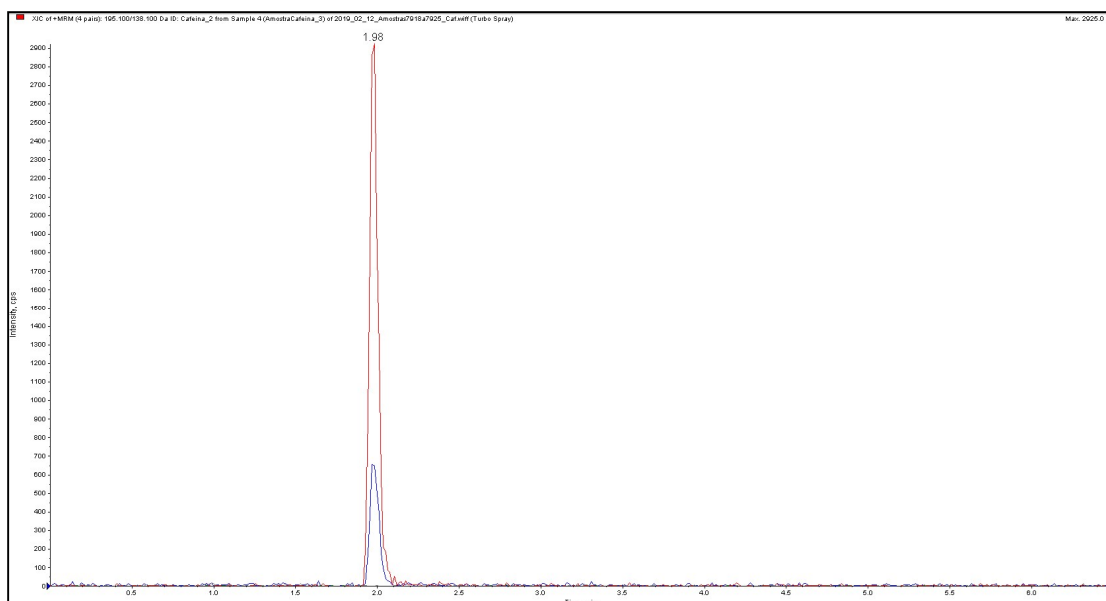
#### Dados:

$$y = ax + b \text{ (fator } 1/x)$$

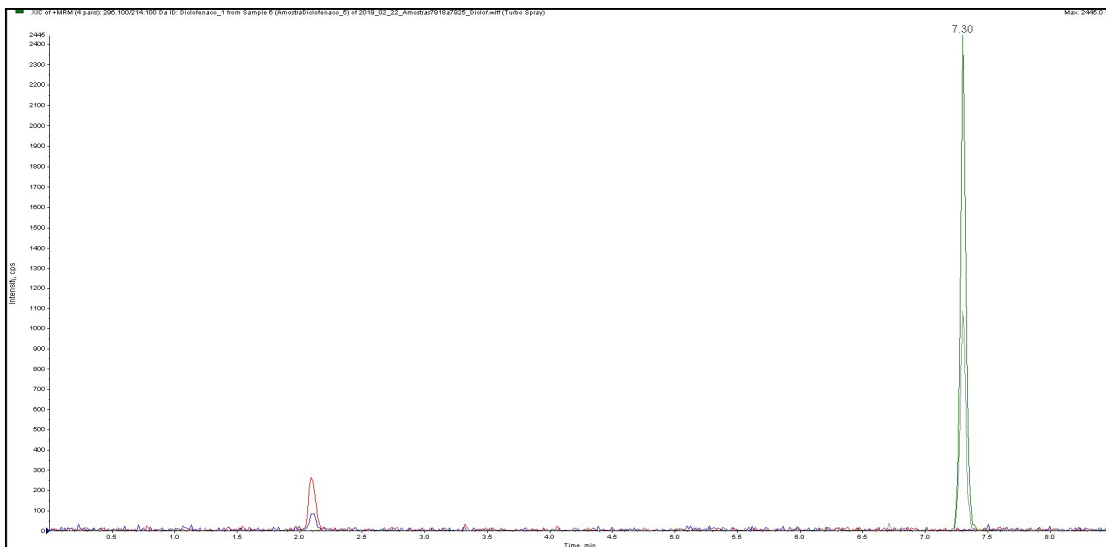
$$y = 1,16 \times 10^4 x + 1,23 \times 10^3$$

$$r \text{ (coeficiente de linearidade)} = 0,9999$$

#### 4. Exemplo Cromatograma.



**FIGURA 3.** Cromatograma (XIC – “Extract Ion Chromatogram”) análise da amostra Amostra Cafeína 3\_7920. Cafeína (Traço Vermelho MRM 195>138/ Traço Azul MRM 195>110). Diclofenaco (Traço Verde MRM 296>214 e Traço Cinza 296>250).



**FIGURA 4.** Cromatograma (XIC – “Extract Ion Chromatogram”) análise da amostra Amostra Diclofenaco 5\_7922. Cafeína (Traço Vermelho MRM 195>138/ Traço Azul MRM 195>110). Diclofenaco (Traço Verde MRM 296>214 e Traço Cinza 296>250).

## RELATÓRIO/LAUDO DE ANÁLISE – Proposta nº M1211-0553

São Paulo, 28 de março de 2019.

**Contratante:** Departamento de Fisiologia – Instituto de Biociências

**Endereço:** Rua do Matão, travessa 14, nº 101 – salas 220/219B – Cidade Universitária.  
CEP: 05508-090 – São Paulo, SP Tel: (11) 3018-1050

**Interessada(o):** Dr. Carlos Arturo Nava Iannini / Dra. Renata G. Moreira

**Análise Solicitada:** Quantificação dos compostos: cafeína e diclofenaco em amostra aquosa proveniente de ensaio biológico.

**Laboratório Executor:** CEMSA – Centro de Espectrometria de Massas Aplicada Ltda.  
CIETEC/IPEN - Av. Prof. Lineu Prestes, 2242  
CEP. 05508-000, São Paulo, SP, Brasil  
Tel. (11) 3039-8358 Fax: (11) 3039-8420

### Cláusulas de Responsabilidade:

Os resultados reportados se referem somente ao material submetido ao ensaio.

Não se admite qualquer responsabilidade referente à exatidão da amostragem, a menos que esta tenha sido efetuada mediante nossa própria supervisão. Salvo menção expressa, as amostras foram livremente selecionadas pelo solicitante.

A reprodução deste relatório está autorizada em sua forma integral. A reprodução parcial só é permitida com a autorização expressa do CEMSA.



|                                                 |                   |                                        |
|-------------------------------------------------|-------------------|----------------------------------------|
| <b>Data de Recebimento das Amostras:</b>        |                   | 22/03/2019                             |
| <b>Amostras:</b>                                |                   | Água (proveniente de ensaio biológico) |
| <b>Total de Amostras Enviadas e Analisadas:</b> |                   | 08                                     |
| <b>Identificação (ID) das Amostras:</b>         | <b>CEMSA ID</b>   | <b>Contratante ID</b>                  |
|                                                 | 8034              | Amostra Controle 1                     |
|                                                 | 8035              | Amostra Controle 2                     |
|                                                 | 8036              | Amostra Cafeína 1                      |
|                                                 | 8037              | Amostra Cafeína 2                      |
|                                                 | 8038              | Amostra Diclofenaco 1                  |
|                                                 | 8039              | Amostra Diclofenaco 2                  |
|                                                 | 8040              | Amostra Mistura 1                      |
| 8041                                            | Amostra Mistura 2 |                                        |

**Interessado:** Dr. Carlos Arturo Nava Iannini **No da Proposta:** M1211-0553  
Dra. Renata G. Moreira

## Resultados das Análises Quantitativas

**Analista:** Daniel Temponi Lebre, MSc.

**Técnica Analítica:** Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) acoplada a analisador de Espectrometria de Massas do tipo Triplo Quadrupolo (EM/EM)

| Amostra_ID do CEMSA        | Concentração de Cafeína ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) | Concentração de Diclofenaco ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) |
|----------------------------|--------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| Amostra Controle 1_8034    | <LOD                                             | 0,0961                                               |
| Amostra Controle 2_8035    | <LOD                                             | 0,0459                                               |
| Amostra Cafeina 1_8036     | 24,3                                             | 0,0442                                               |
| Amostra Cafeina 2_8037     | 29,8                                             | 0,0374                                               |
| Amostra Diclofenaco 1_8038 | <LOD                                             | 0,549                                                |
| Amostra Diclofenaco 2_8039 | <LOD                                             | 0,571                                                |
| Amostra Mistura 1_8040     | 16,9                                             | 0,542                                                |
| Amostra Mistura 2_8041     | 27,7                                             | 0,602                                                |

**Data de Realização das Análises:** 25/03/2019 (Cafeína) e 27/03/2019 (Diclofenaco)

Limite de Detecção Cafeína (LOD):  $1,5 \mu\text{g L}^{-1}$

Limite de Quantificação Cafeína (LOQ):  $5,1 \mu\text{g L}^{-1}$

Limite de Detecção Diclofenaco (LOD):  $0,004 \mu\text{g L}^{-1}$

Limite de Quantificação Diclofenaco (LOQ):  $0,014 \mu\text{g L}^{-1}$

**MSc. Daniel Temponi Lebre - CRQ: 04146260**  
Diretor Técnico – Científico

## 1. Informações Gerais da Análise

### 1.1. Instrumentação Analítica

TABELA 1. Equipamento de CLAE-EM/EM.

| Equipamentos                          | Modelo              | Marca                |
|---------------------------------------|---------------------|----------------------|
| CLAE (Bomba binária, desgaseificador) | Agilent 1260 series | Agilent Technologies |
| Injetor automático                    | Agilent 1260series  | Agilent Technologies |
| Espectrômetro de Massas (EM/EM)       | Agilent 1260series  | Sciex                |
| Fonte                                 | 3200 QTRAP          | Sciex                |
| Programa de Aquisição de Dados        | Analyst 1.5.2       | Sciex                |

### 1.2. Reagentes

TABELA 2. Reagentes utilizados.

| Reagentes                   | Marca          | Especificação |
|-----------------------------|----------------|---------------|
| Acetonitrila                | J.T.Baker      | Grau CLAE     |
| Água                        | Millipore      | 18,2 mΩ       |
| Ácido Fórmico               | Sigma- Aldrich | Grau CLAE-EM  |
| Acetato de Etila            | Macron         | Grau PA-ASC   |
| Diclofenaco (CEMSA ID 5848) | Sigma- Aldrich | 93484-100     |
| Cafeína                     | Sigma- Aldrich | C0750-100     |

### 1.3. Materiais e Equipamentos Periféricos

TABELA 3. Materiais e equipamentos periféricos.

| Material                       | Especificação           |
|--------------------------------|-------------------------|
| Pipeta Automática              | 20-200 µL / 100-1000 µL |
| Microtubo plástico (Eppendorf) | 1,5 a 2 mL              |
| Balança Analítica (Shimadzu)   | Min 1 mg                |

#### 1.4. Metodologia desenvolvida para análise por CLAE-EM/EM

##### 1.4.1. Condições da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

TABELA 4. Condições de Separação Cromatográfica.

| Parâmetro         | Condição utilizada                                                             |
|-------------------|--------------------------------------------------------------------------------|
| Coluna            | Luna C18 HST (2) (100 x 2,0 mm; 2,5µm)<br>(Phenomenex)<br>Temp. coluna: 35C    |
| Fase móvel        | A: água ultrapura + 0.1% ácido fórmico<br>B: Acetonitrila + 0.1% ácido fórmico |
| Fluxo             | 220 µL.min <sup>-1</sup>                                                       |
| Volume de injeção | 5 µL (10 µL – Diclofenaco)                                                     |
| Tempo de corrida  | 6,5 minutos (Cafeína) e 8.50 (Diclofenaco)                                     |

TABELA 5. Gradiente de Eluição.

| Tempo (minutos)   | A (%) | B (%) |
|-------------------|-------|-------|
| 2,30 (equilíbrio) | 80    | 20    |
| 0,30              | 80    | 20    |
| 0,31              | 10    | 90    |
| 4,00              | 10    | 90    |
| 4,01              | 80    | 20    |
| 6,50              | 80    | 20    |

Tempo de Retenção Cafeína: 2,00 minutos.

Tempo de Retenção Diclofenaco: 7,50 minutos.

#### 1.4.2. Condições do espectrômetro de massas

TABELA 6. Parâmetros da Fonte de íons

| Parâmetros – Modo Positivo | Valores |
|----------------------------|---------|
| Curtain Gas                | 15      |
| ElectroSpray Voltage       | 5200    |
| Source Temp.               | 350 °C  |
| Gas 1 (nebulizer)          | 45 u.a. |
| Gas 2 (heater gas)         | 50 u.a. |
| CAD (Collision Gas)        | Medium  |

\*u.a. = unidades arbitrárias.

#### 1.4.3. Analisador EM/EM (modo Multiple Reaction Monitoring):

TABELA 7. Parâmetros do Analisador de Massas

| Compostos          | Q1 (m/z)     | Q3 (m/z)     | Dwell time (msec) | DP (V) | EP (V) | CEP (V) | CE (eV) | CXP (V) |
|--------------------|--------------|--------------|-------------------|--------|--------|---------|---------|---------|
| <b>Cafeína</b>     | <b>195,1</b> | 110,1        | 200               |        |        |         | 27      | 2       |
|                    |              | <b>138,1</b> | 200               | 48     | 7      | 15      | 22      | 2       |
|                    |              | <b>214,1</b> | 200               |        |        |         | 39      | 4       |
| <b>Diclofenaco</b> | <b>296,1</b> | 250,0        | 200               | 21     | 6,5    | 14      | 19      | 4       |

\*Valores em negrito: Transição utilizada para a quantificação dos compostos analisados.

## 2. Preparo dos padrões analíticos e amostra

### 2.1. Preparo dos Padrões Analítico

#### 2.1.1. Solução Padrão Estoque da Cafeína (SEC)

Pesou-se 1,64mg do padrão de cafeína (Sigma Aldrich - C0750-100) em microtubo de 1,5 mL. Adicionou-se 1,64 mL de sol. 50%ACN/50% H<sub>2</sub>O (v/v) e homogeneizou-se em vortex por 30 segundos. Armazenamento em geladeira 8°C.

**Concentração de diclofenaco: 1,00 mg mL<sup>-1</sup> (1000 µg mL<sup>-1</sup>).**

#### 2.1.2. Solução Padrão Intermediária de Cafeína (SIC-I 100)

Em microtubo de 1,5 mL procedeu-se a diluição das soluções padrão, utilizando uma solução de 50%ACN/50% H<sub>2</sub>O (v/v). Para 1 mL, dilui-se 100 µL da solução estoque SEC para 900 µL da solução de diluição. Armazenamento em geladeira 3°C.

**Concentração final de cafeína: 100 µg mL<sup>-1</sup>.**

#### 2.1.3. Solução Padrão Intermediária de Cafeína (SIC-I 10)

Em microtubo de 1,5 mL procedeu-se a diluição das soluções padrão, utilizando uma solução de 50%ACN/50% H<sub>2</sub>O (v/v). Para 1 mL, dilui-se 100 µL da sol. SIC-I 100 para 900 µL da solução de diluição. Armazenamento em geladeira 3°C.

**Concentração final de cafeína: 10 µg mL<sup>-1</sup>.**

#### 2.1.4. Solução Padrão Intermediária de Cafeína (SIC-T)

Em microtubo de 1,5 mL procedeu-se a diluição das soluções padrão, utilizando uma solução de H<sub>2</sub>O. Para 1 mL, dilui-se 16 µL da sol. SIC-I 10 para 984 µL de H<sub>2</sub>O. Armazenamento em geladeira 3°C.

**Concentração final de cafeína: 0.16 µg mL<sup>-1</sup>.**

#### 2.1.5. Solução Padrão Estoque do Diclofenaco (SED)

Pesou-se 1,90 mg do padrão de diclofenaco de sódio) (CEMSA ID: 5848) (1,77 mg diclofenaco em microtubo de 1,5 mL. Adicionou-se 1,77 mL de sol. 50%ACN/50% H<sub>2</sub>O (v/v) e homogeneizou-se em vortex por 30 segundos. Armazenamento em geladeira 8°C.

**Concentração de diclofenaco: 1,00 mg mL<sup>-1</sup> (1000 µg mL<sup>-1</sup>).**

**OBS.:** foi realizada a correção da pesagem da massa, devido ao padrão diclofenaco de sódio.

#### 2.1.6. Solução Padrão Intermediária de Diclofenaco (SID-I 100)

Em microtubo de 1,5 mL procedeu-se a diluição das soluções padrão, utilizando uma solução de 50%ACN/50% H<sub>2</sub>O (v/v). Para 1 mL, dilui-se 100 µL da solução estoque SED para 900 µL da solução de diluição. Armazenamento em geladeira 3°C.

**Concentração final de cafeína: 100 µg mL<sup>-1</sup>.**

### **2.1.7. Solução Padrão Intermediária de Diclofenaco (SID-I 10)**

Em microtubo de 1,5 mL procedeu-se a diluição das soluções padrão, utilizando uma solução de 50%ACN/50% H<sub>2</sub>O (v/v). Para 1 mL, dilui-se 100 µL da sol. SID-I 100 para 900 µL da solução de diluição. Armazenamento em geladeira 3°C.

**Concentração final de cafeína: 10 µg mL<sup>-1</sup>.**

### **2.1.4 Solução Padrão Intermediária de Diclofenaco (SID-T)**

Em microtubo de 1,5 mL procedeu-se a diluição das soluções padrão, utilizando uma solução de H<sub>2</sub>O. Para 1 mL, dilui-se 16 µL da sol. SID-I 10 para 984 µL de H<sub>2</sub>O. Armazenamento em geladeira 3°C.

**Concentração final de cafeína: 0.16 µg mL<sup>-1</sup>.**

## **2.2. Preparo das Amostras para a Análise de Cafeína**

As amostras foram ambientadas, aliqüotadas e injetadas diretamente no sistema CLAE-EM/EM.

## **2.2 Preparo das Amostras para a Análise de Diclofenaco**

Extração Líquido- Líquido (LLE) para concentração da amostra e preparo da curva analítica.

- Em tubo de ensaio de vidro de 14 mL adicionar 2,0 mL de amostra (ou curva analítica preparada em água)
- Adicionar 2,0 mL de acetato de etila. Agitar em vortex por 30 segundos. Centrifugar à 2000 rpm.
- Retirar aproximadamente 1800 uL da fase orgânica e transferir para um tubo de ensaio de vidro de 7,0 mL.
- Secar a fase orgânica sob fluxo de ar à 40°C.
- Dissolver o resíduo com 180 uL de solução 80%H<sub>2</sub>O/20% ACN (v/v). Agitar em vortex por 10 segundos.
- Transferir para um poço na placa de 96 ou em vial.
- Injetar no sistema de CLAE-EM/EM.

### 3. Curva Analítica

#### 3.1. Preparo Curva Analítica

A curva analítica foi preparada para cafeína nas seguintes concentrações, informada na tabela 8.

TABELA 8. Curva Analítica Cafeína (em H<sub>2</sub>O).

| Ponto | Concentração de Cafeína<br>( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) ou ( $\text{ng mL}^{-1}$ ) | Diluição em H <sub>2</sub> O (vol final 250 $\mu\text{L}$ ) |
|-------|--------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| P1    | 5                                                                              | 1:1 P1                                                      |
| P2    | 10                                                                             | 1:1 P3                                                      |
| P3    | 20                                                                             | 1:1 P4                                                      |
| P4    | 40                                                                             | 1:1 P5                                                      |
| P5    | 80                                                                             | 1:1 P6                                                      |
| P6    | 160                                                                            | SIC-T                                                       |

P0 – 100% H<sub>2</sub>O (Branco)

#### Curva Analítica da Cafeína

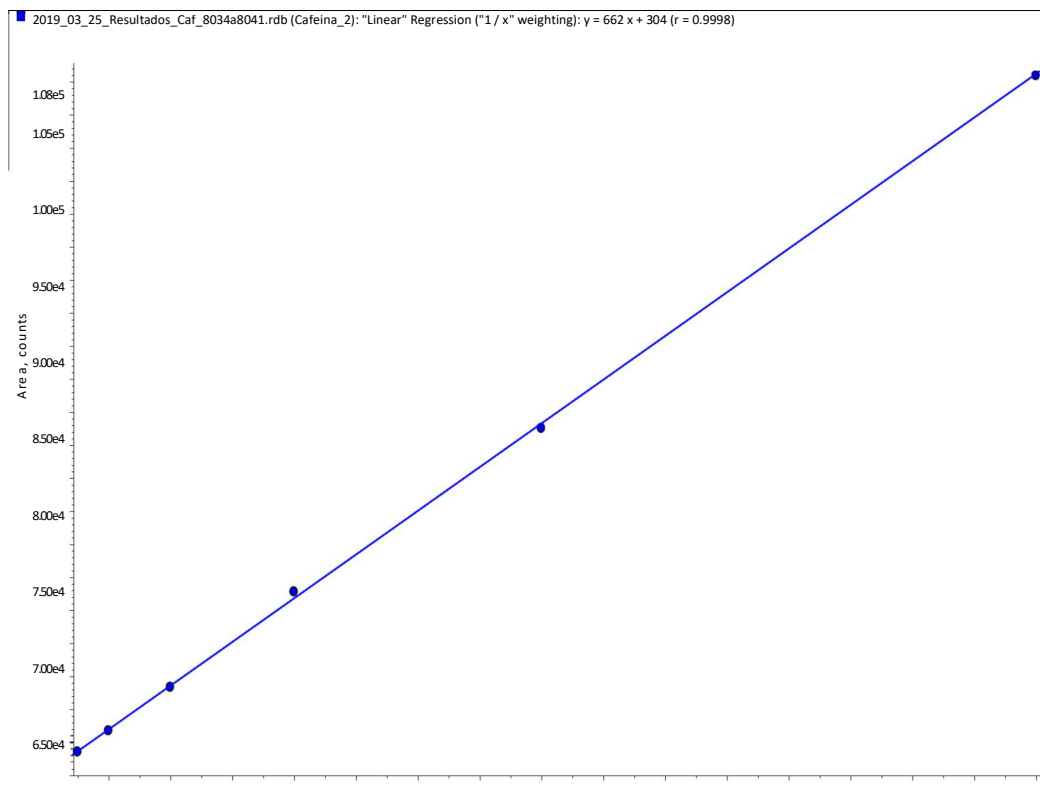


FIGURA 1. Curva Analítica da Cafeína.

Dados:

$$y = ax + b \text{ (fator } 1/x)$$

$$y = 662x + 304$$

$$r \text{ (coeficiente de linearidade)} = 0,9998$$



### 3.2. Curva Analítica do Diclofenaco

A curva analítica foi preparada nas seguintes concentrações, informada na tabela 9.

TABELA 9. Curva Analítica Diclofenaco (em H<sub>2</sub>O).

| Ponto | Concentração de Cafeína<br>(ug L <sup>-1</sup> ) ou (ng mL <sup>-1</sup> ) | Diluição em H <sub>2</sub> O (vol final 8.0 mL) |
|-------|----------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| P1    | 0.10                                                                       | 1:1 P1                                          |
| P2    | 0.20                                                                       | 1:1 P3                                          |
| P3    | 0.40                                                                       | 1:1 P4                                          |
| P4    | 0.80                                                                       | 1:1 P5                                          |
| P5    | 1.60                                                                       | 80 uL de SID-T em 7.92 mL de H <sub>2</sub> O   |

P0 – 100% H<sub>2</sub>O (Branco). Após o preparo as soluções da curva foram submetidas a extração LLE.

### Curva Analítica do Diclofenaco

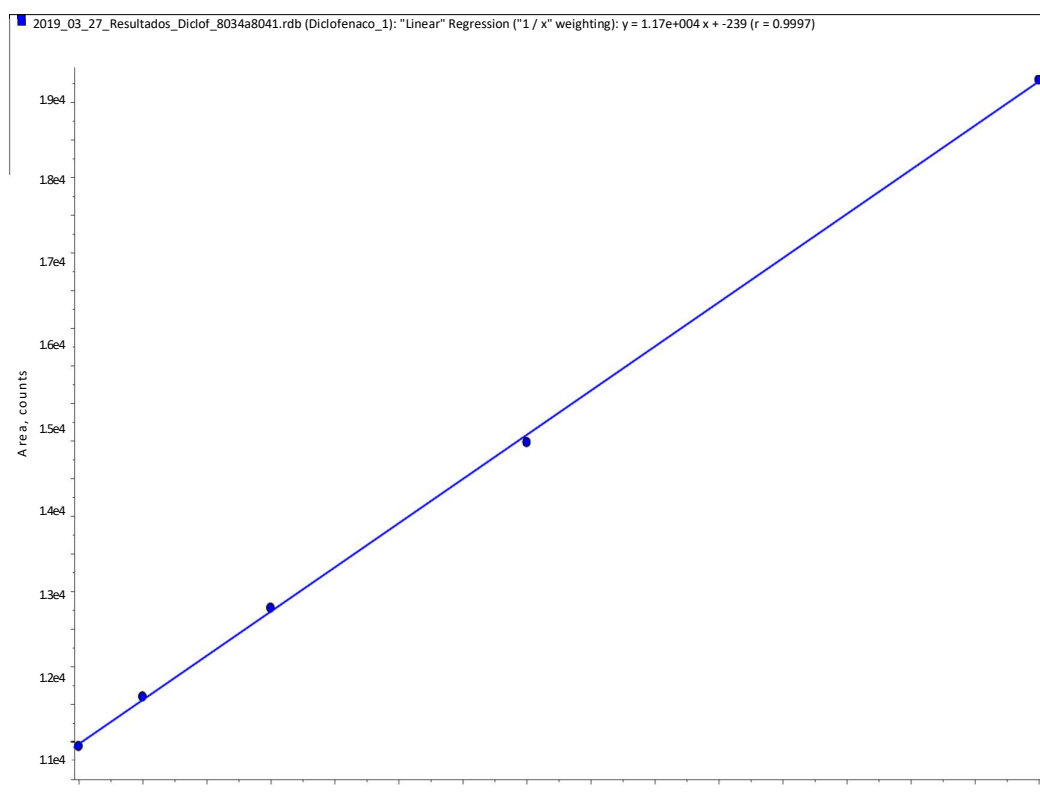


FIGURA 2. Curva Analítica do Diclofenaco.

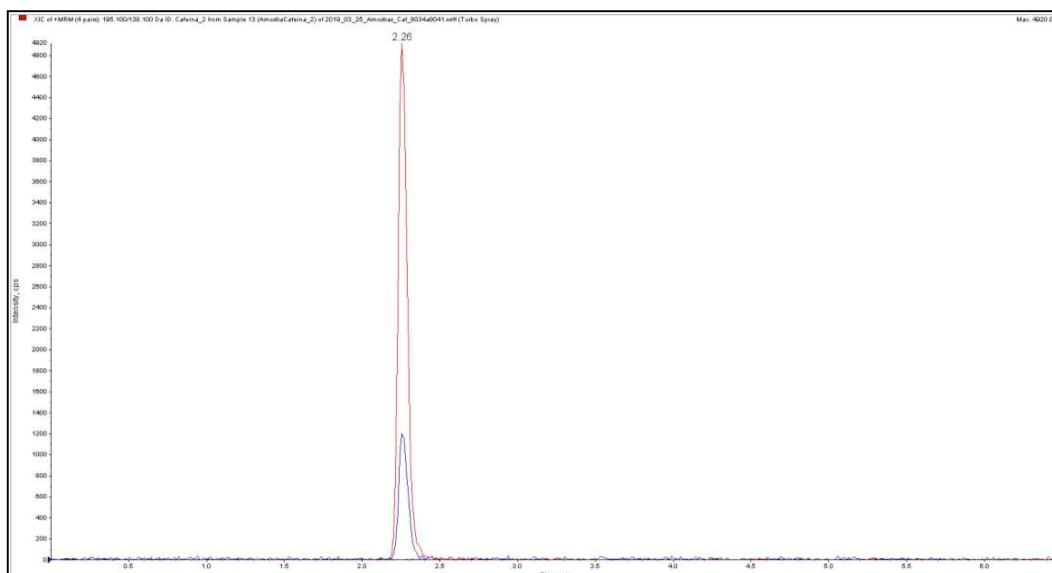
#### Dados:

$$y = ax + b \text{ (fator } 1/x)$$

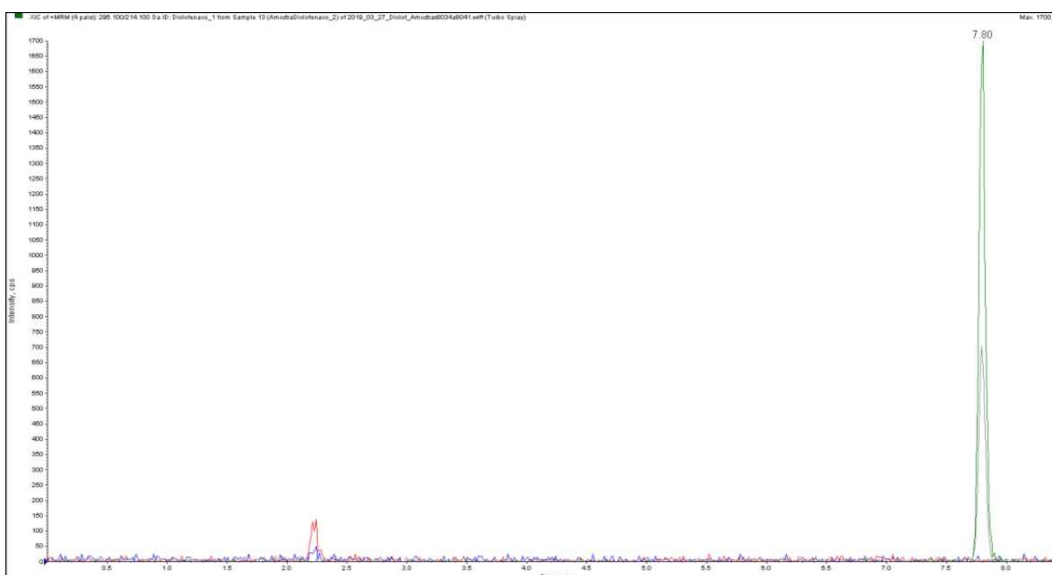
$$y = 1,17 \times 10^4 x - 239$$

$$r \text{ (coeficiente de linearidade)} = 0,9997$$

#### 4. Exemplo Cromatograma.



**FIGURA 3.** Cromatograma (XIC – “Extract Ion Chromatogram”) análise da amostra Cafeína 2\_8037. Cafeína (Traço Vermelho MRM 195>138/ Traço Azul MRM 195>110). Diclofenaco (Traço Verde MRM 296>214 e Traço Cinza 296>250).



**FIGURA 4.** Cromatograma (XIC – “Extract Ion Chromatogram”) análise da Amostra Diclofenaco 2\_8039. Cafeína (Traço Vermelho MRM 195>138/ Traço Azul MRM 195>110). Diclofenaco (Traço Verde MRM 296>214 e Traço Cinza 296>250).

**ANEXO 5. ANÁLISES E RESULTADOS DA CONCENTRAÇÃO DE FÁRMACOS: CAMPO INVERNO**

| <b>CEMSA ID</b> | <b>Contratante ID</b>  | <b>Amostra no paper</b> |
|-----------------|------------------------|-------------------------|
| <b>5795</b>     | 22 FÁrmaco             | Barragem                |
| <b>5796</b>     | 22_ FÁrmaco            | Barragem                |
| <b>5797</b>     | 24_ FÁrmaco            | Aracati                 |
| <b>5798</b>     | 24_ FÁrmaco            | Aracati                 |
| <b>5799</b>     | 26_ Far                | Embu-Guaçu              |
| <b>5800</b>     | 26_ Far                | Embu-Guaçu              |
| <b>5801</b>     | Ponte Nova Diclofenaco | -                       |
| <b>5802</b>     | Ponte Nova Cafeína     | -                       |
| <b>5803</b>     | 28                     | Bororé                  |
| <b>5804</b>     | 28                     | Bororé                  |
| <b>5805</b>     | 30                     | Pedreira                |
| <b>5806</b>     | 30                     | Pedreira                |
| <b>5807</b>     | 32                     | -                       |
| <b>5808</b>     | 32                     | -                       |
| <b>5809</b>     | 34                     | -                       |
| <b>5810</b>     | 34                     | -                       |
| <b>5824</b>     | 18 FAR                 | -                       |
| <b>5825</b>     | 22 FAR                 | -                       |
| <b>5826</b>     | 24 FÁrmacos            | -                       |
| <b>5827</b>     | 26 FÁrmacos            | -                       |
| <b>5868</b>     | 20 FAR                 | -                       |
| <b>5869</b>     | 28 FÁrmacos            | -                       |
| <b>5870</b>     | 30 FÁrmacos            | -                       |
| <b>5871</b>     | 32 FÁrmacos            | -                       |
| <b>5872</b>     | 34 FÁrmacos            | -                       |

## RELATÓRIO/LAUDO DE ANÁLISE – Proposta nº M1211-0462

São Paulo, 03 de outubro de 2017.

**Contratante:** Departamento de Fisiologia – Instituto de Biociências  
**Endereço:** Rua do Matão, travessa 14, nº 101 – salas 220/219B –  
Cidade Universitária. CEP: 05508-090 – São Paulo, SP  
Tel: (11) 3018-1050

**Interessada(o):** Dr. Carlos Arturo Nava Iannini / Dra. Renata G. Moreira  
**Análise Solicitada:** Quantificação dos compostos: cafeína e diclofenaco em  
água superficial (doce) e sedimentos.

**Laboratório Executor:** CEMSA – Centro de Espectrometria de Massas Aplicada  
Ltda.  
CIETEC/IPEN - Av. Prof. Lineu Prestes, 2242 CEP.  
05508-000, São Paulo, SP, Brasil  
Tel. (11) 3039-8358 Fax: (11) 3039-8420

### Cláusulas de Responsabilidade:

Os resultados reportados se referem somente ao material submetido ao ensaio.

Não se admite qualquer responsabilidade referente à exatidão da amostragem, a menos que esta tenha sido efetuada mediante nossa própria supervisão. Salvo menção expressa, as amostras foram livremente selecionadas pelo solicitante.

A reprodução deste relatório está autorizada em sua forma integral. A reprodução parcial só é permitida com a autorização expressa do CEMSA.

**Data de Recebimento das Amostras:** 11/08/2017, 23/08/2017 e 20/09/2017

**Amostras:** Água Superficial (Doce) e Sedimentos

**Total de Amostras Enviadas e Analisadas:** 25

|                                         | <b>CEMSA ID</b> | <b>Contratante ID</b>  |
|-----------------------------------------|-----------------|------------------------|
|                                         | 5795            | 22 Farmaco             |
|                                         | 5796            | 22_Farmaco             |
|                                         | 5797            | 24_Farmaco             |
|                                         | 5798            | 24_Farmaco             |
|                                         | 5799            | 26_Far                 |
|                                         | 5800            | 26_Far                 |
|                                         | 5801            | Ponte Nova Diclofenaco |
| <b>Identificação (ID) das Amostras:</b> | 5802            | Ponte Nova Cafeina     |
|                                         | 5803            | 28                     |
|                                         | 5804            | 28                     |
|                                         | 5805            | 30                     |
|                                         | 5806            | 30                     |
|                                         | 5807            | 32                     |
|                                         | 5808            | 32                     |
|                                         | 5809            | 34                     |
|                                         | 5810            | 34                     |
|                                         | 5824            | 18 FAR                 |
|                                         | 5825            | 22 FAR                 |
|                                         | 5826            | 24 Farmacos            |
|                                         | 5827            | 26 Farmacos            |
|                                         | 5868            | 20 FAR                 |
|                                         | 5869            | 28 Farmacos            |
|                                         | 5870            | 30 Farmacos            |
|                                         | 5871            | 32 Farmacos            |
|                                         | 5872            | 34 Farmacos            |

**Interessado:** Dr. Carlos A. Navas Iannini  
**Dra. Renata G. Moreira**

**No da Proposta:** M1211-0462  
**Nº páginas:** 03/05

### Resultados das Análises Quantitativas

**Analista:** Daniel Temponi Lebre, MSc.

**Técnica Analítica:** Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) acoplada a analisador de Espectrometria de Massas do tipo Triplo Quadrupolo (EM/EM)

| <b>Amostra (ID do CEMSA)</b> | <b>Concentração de Cafeína (ng L<sup>-1</sup>)</b> | <b>Concentração de Diclofenaco (ng L<sup>-1</sup>)</b> |
|------------------------------|----------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| 22 Farmaco_5795              | 108                                                | < LOD                                                  |
| 22_Farmaco_5796              | 174                                                | < LOQ                                                  |
| 24_Farmaco_5797              | 1570                                               | 9,61                                                   |
| 24_Farmaco_5798              | 129                                                | < LOQ                                                  |
| 26_Far_5799                  | 1590                                               | 12,7                                                   |
| 26_Far_5800                  | 183                                                | < LOQ                                                  |
| Ponte Nova Diclofenaco_5801  | 36,5                                               | < LOD                                                  |
| Ponte Nova Cafeina_5802      | 39,6                                               | < LOD                                                  |
| 28_5803                      | 19,9                                               | < LOQ                                                  |
| 28_5804                      | 26,1                                               | < LOD                                                  |
| 30_5805                      | < LOD                                              | < LOQ                                                  |
| 30_5806                      | < LOQ                                              | < LOQ                                                  |

**Data de Realização das Análises:** 22 e 28/09/2017



**MSc. Daniel Temponi Lebre - CRQ: 04146260**  
Diretor Técnico – Científico

**Interessado:** Dr. Carlos A. Navas Iannini  
Dra. Renata G. Moreira

**No da Proposta:** M1211-0462  
**Nº páginas:** 04/05

---

### Resultados das Análises Quantitativas

**Analista:** Daniel Temponi Lebre, MSc.

**Técnica Analítica:** Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) acoplada a analisador de Espectrometria de Massas do tipo Triplo Quadrupolo (EM/EM)

---

| Amostra<br>(ID do CEMSA) | Concentração de Cafeína<br>(ng L <sup>-1</sup> ) | Concentração de Diclofenaco<br>(ng L <sup>-1</sup> ) |
|--------------------------|--------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| 32_5807                  | 136                                              | < LOD                                                |
| 32_5808                  | 151                                              | < LOD                                                |
| 34_5809                  | 50,0                                             | < LOD                                                |
| 34_5810                  | 48,7                                             | < LOD                                                |

---

**Data de Realização das Análises:** 28/09/2017

---

| Amostra<br>(ID do CEMSA) | Concentração Cafeína<br>(ng g <sup>-1</sup> ) | Concentração Diclofenaco<br>(ng g <sup>-1</sup> ) |
|--------------------------|-----------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| 18 FAR_5824              | < LOD                                         | < LOD                                             |
| 22 FAR_5825              | < LOD                                         | < LOD                                             |
| 24 Farmacos_5826         | < LOQ                                         | < LOD                                             |
| 26 Farmacos_5827         | < LOQ                                         | < LOD                                             |
| 20 FAR_5868              | 14,5                                          | < LOD                                             |
| 28 Farmacos_5869         | 18,3                                          | < LOD                                             |
| 30 Farmacos_5870         | < LOQ                                         | < LOD                                             |
| 32 Farmacos_5871         | < LOD                                         | < LOD                                             |
| 34 Farmacos_5872         | 9,39                                          | 22,9                                              |

---

**Data de Realização das Análises:** 22 e 28/09/2017; 02/10/2017.



**MSc. Daniel Temponi Lebre - CRQ: 04146260**  
Diretor Técnico – Científico

### Informações Gerais das Análises:

1. As análises das amostras de água superficial e análise dos sedimentos foram realizadas conforme metodologia analítica validada na tese de doutorado publicada: Shihomatzu, H. M. – Desenvolvimento e Validação de Metodologia SPE-LC-MS/MS para determinação de Fármacos e Droga de Abuso nas Águas da Represa Guarapiranga – São Paulo/SP, Brasil – IPEN/USP – 2015 – <https://doi.org/10.11606/T.85.2015.tde-28042015-095207>.
2. A extração dos fármacos em sedimento foi realizada por procedimento “QUECHERS” e similar à dissertação de mestrado publicada: de Oliveira, J. P. R. – Estudos de Poluentes Orgânicos Persistentes (POPs) em Regiões Industriais da Grande São Paulo – via Cromatografia a Gás acoplada a Espectrometria de Massas (GC-MS) e Captura de Elétrons (GC-ECD) – IPEN/USP – 2011.
3. Equipamento utilizado:

| Equipamentos                                                                               | Modelo             | Marca                |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|----------------------|
| Espectrômetro de massas (EM/EM)                                                            | 3200 QTRAP         | AB Sciex             |
| Sistema de Cromatografia Líquida (Bomba binária, Auto- amostrador, Forno de Coluna) - CLAE | Agilent Serie 1260 | Agilent Technologies |
| Fonte de íons                                                                              | Electrospray (ESI) | AB Sciex             |

#### 4. Amostras de Água Superficial:

Limite de Detecção Cafeína (LOD): 2,2 ng L<sup>-1</sup>  
Limite de Quantificação Cafeína (LOQ): 8,5 ng L<sup>-1</sup>  
Limite de Detecção Diclofenaco (LOD): 1,0 ng L<sup>-1</sup>  
Limite de Quantificação Diclofenaco (LOQ): 7,4 ng L<sup>-1</sup>

#### 5. Amostras de Sedimento (Valores aproximados):

Limite de Detecção Cafeína (LOD): 2,2 ng g<sup>-1</sup>  
Limite de Quantificação Cafeína (LOQ): 8,5 ng g<sup>-1</sup>  
Limite de Detecção Diclofenaco (LOD): 1,0 ng g<sup>-1</sup>  
Limite de Quantificação Diclofenaco (LOQ): 7,4 ng g<sup>-1</sup>



**ANEXO 6. ANÁLISES E RESULTADOS DA CONCENTRAÇÃO DE FÁRMACOS: CAMPO VERÃO**

| <b>CEMSA ID</b> | <b>Contratante ID</b>            | <b>Amostra no paper</b> |
|-----------------|----------------------------------|-------------------------|
| 6226            | Far_36 (sedimento)               | -                       |
| 6227            | Far_38 (sedimento)               | -                       |
| 6228            | Far_36 (água superficial)        | -                       |
| 6229            | Far_38 (água superficial)        | -                       |
| 6236            | Far_40 (água superficial)        | Barragem                |
| 6237            | Far_42 (água superficial)        | Aracati                 |
| 6238            | Far_44 (água superficial)        | Embu-Guaçu              |
| 6244            | USP_IB_FAR_40 (sedimento)        | -                       |
| 6245            | USP_IB_FAR_42 (sedimento)        | -                       |
| 6246            | USP_IB_FAR_44 (sedimento)        | -                       |
| 6247            | IB_USP_FAR_46 (água superficial) | Pedreira                |
| 6248            | IB_USP_FAR_48 (água superficial) | -                       |
| 6249            | IB_USP_FAR_50 (água superficial) | Bororé                  |
| 6250            | USP_IB_FAR_46 (sedimento)        | -                       |
| 6251            | USP_IB_FAR_48 (sedimento)        | -                       |
| 6252            | USP_IB_FAR_50 (sedimento)        | -                       |

## RELATÓRIO/LAUDO DE ANÁLISE – Proposta nº M1211-0488

São Paulo, 22 de fevereiro de 2018.

**Contratante:** Departamento de Fisiologia – Instituto de Biociências

**Endereço:** Rua do Matão, travessa 14, nº 101 – salas 220/219B –  
Cidade Universitária.  
CEP: 05508-090 – São Paulo, SP Tel: (11) 3018-1050

**Interessada(o):** Dr. Carlos Arturo Nava Iannini / Dra. Renata G. Moreira

**Análise Solicitada:** Quantificação dos compostos: cafeína e diclofenaco em  
água superficial (doce) e sedimentos.

**Laboratório Executor:** CEMSA – Centro de Espectrometria de Massas Aplicada  
Ltda.  
CIETEC/IPEN - Av. Prof. Lineu Prestes, 2242 CEP.  
05508-000, São Paulo, SP, Brasil  
Tel. (11) 3039-8358 Fax: (11) 3039-8420

### Cláusulas de Responsabilidade:

Os resultados reportados se referem somente ao material submetido ao ensaio.

Não se admite qualquer responsabilidade referente à exatidão da amostragem, a menos que esta tenha sido efetuada mediante nossa própria supervisão. Salvo menção expressa, as amostras foram livremente selecionadas pelo solicitante.

A reprodução deste relatório está autorizada em sua forma integral. A reprodução parcial só é permitida com a autorização expressa do CEMSA.

**Data de Recebimento das Amostras:** 29/01/2018, 05/02/2018, 09/02/2018 e 15/02/2018

**Amostras:** Água Superficial (Doce) e Sedimentos

**Total de Amostras Enviadas e Analisadas:** 16

|                                         | <b>CEMSA ID</b> | <b>Contratante ID</b>            |
|-----------------------------------------|-----------------|----------------------------------|
|                                         | 6226            | Far_36 (sedimento)               |
|                                         | 6227            | Far_38 (sedimento)               |
|                                         | 6228            | Far_36 (água superficial)        |
|                                         | 6229            | Far_38 (água superficial)        |
|                                         | 6236            | Far_40 (água superficial)        |
|                                         | 6237            | Far_42 (água superficial)        |
|                                         | 6238            | Far_44 (água superficial)        |
| <b>Identificação (ID) das Amostras:</b> | 6244            | USP_IB_FAR_40 (sedimento)        |
|                                         | 6245            | USP_IB_FAR_42 (sedimento)        |
|                                         | 6246            | USP_IB_FAR_44 (sedimento)        |
|                                         | 6247            | IB_USP_FAR_46 (água superficial) |
|                                         | 6248            | IB_USP_FAR_48 (água superficial) |
|                                         | 6249            | IB_USP_FAR_50 (água superficial) |
|                                         | 6250            | USP_IB_FAR_46 (sedimento)        |
|                                         | 6251            | USP_IB_FAR_48 (sedimento)        |
|                                         | 6252            | USP_IB_FAR_50 (sedimento)        |

**Interessado:** Dr. Carlos Arturo Nava Iannini **No da Proposta:** M1211-0488  
Dra. Renata G. Moreira

**Nº páginas:** 03/05

---

## Resultados das Análises Quantitativas

**Analista:** Daniel Temponi Lebre, MSc.

**Técnica Analítica:** Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) acoplada a analisador de Espectrometria de Massas do tipo Triplo Quadrupolo (EM/EM)

| Amostras de Água Superficial<br>(ID do CEMSA) | Concentração de Cafeína<br>(ng L <sup>-1</sup> ) | Concentração de Diclofenaco<br>(ng L <sup>-1</sup> ) |
|-----------------------------------------------|--------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| Far_36_6228                                   | 109                                              | < LOQ                                                |
| Far_38_6229                                   | 41.7                                             | < LOQ                                                |
| Far_40_6236                                   | 285                                              | < LOQ                                                |
| Far_42_6237                                   | 224                                              | < LOQ                                                |
| Far_44_6238                                   | 132                                              | < LOQ                                                |
| IB_USP_FAR_46_6247                            | 172                                              | < LOQ                                                |
| IB_USP_FAR_48_6248                            | 309                                              | < LOD                                                |
| IB_USP_FAR_50_6249                            | 183                                              | < LOQ                                                |

**Data de Realização das Análises:** 21/02/2018.



**MSc. Daniel Temponi Lebre - CRQ: 04146260**  
Diretor Técnico – Científico

**Interessado:** Dr. Carlos Arturo Nava Iannini **No da Proposta:** M1211-0488

Dra. Renata G. Moreira

**Nº páginas:** 04/05

---

### Resultados das Análises Quantitativas

**Analista:** Daniel Temponi Lebre, MSc.

**Técnica Analítica:** Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) acoplada a analisador de Espectrometria de Massas do tipo Triplo Quadrupolo (EM/EM)

| Amostras de Sedimento (ID do CEMSA) | Concentração Cafeína (ng g <sup>-1</sup> ) | Concentração Diclofenaco (ng g <sup>-1</sup> ) |
|-------------------------------------|--------------------------------------------|------------------------------------------------|
| Far_36_6226                         | < LOD                                      | < LOD                                          |
| Far_38_6227                         | < LOD                                      | < LOD                                          |
| USP_IB_FAR_40_6244                  | < LOD                                      | < LOD                                          |
| USP_IB_FAR_42_6245                  | < LOQ                                      | < LOD                                          |
| USP_IB_FAR_44_6246                  | < LOD                                      | < LOD                                          |
| USP_IB_FAR_46_6250                  | < LOQ                                      | < LOD                                          |
| USP_IB_FAR_48_6251                  | < LOD                                      | < LOD                                          |
| USP_IB_FAR_50_6252                  | < LOD                                      | < LOD                                          |

**Data de Realização das Análises:** 21/02/2018.

**MSc. Daniel Temponi Lebre - CRQ: 04146260**  
Diretor Técnico – Científico

**Interessado:** Dr. Carlos Arturo Nava Iannini **No da Proposta:** M1211-0488

Dra. Renata G. Moreira

**Nº páginas:** 05/05

---

**Informações Gerais das Análises:**

1. As análises das amostras de água superficial e análise dos sedimentos foram realizadas conforme metodologia analítica validada na tese de doutorado publicada: Shihomatzu, H. M. – Desenvolvimento e Validação de Metodologia SPE-LC-MS/MS para determinação de Fármacos e Droga de Abuso nas Águas da Represa Guarapiranga – São Paulo/SP, Brasil – IPEN/USP – 2015 – <https://doi.org/10.11606/T.85.2015.tde-28042015-095207>.

2. A extração dos fármacos em sedimento foi realizada por procedimento “QUECHERS” e similar à dissertação de mestrado publicada: de Oliveira, J. P. R. – Estudos de Poluentes Orgânicos Persistentes (POPs) em Regiões Industriais da Grande São Paulo – via Cromatografia a Gás acoplada a Espectrometria de Massas (GC-MS) e Captura de Elétrons (GC-ECD) – IPEN/USP – 2011.

3. Equipamento utilizado:

| Equipamentos                                                                               | Modelo             | Marca                |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|----------------------|
| Espectrômetro de massas (EM/EM)                                                            | 3200 QTRAP         | AB Sciex             |
| Sistema de Cromatografia Líquida (Bomba binária, Auto- amostrador, Forno de Coluna) - CLAE | Agilent Serie 1260 | Agilent Technologies |
| Fonte de íons                                                                              | Electrospray (ESI) | AB Sciex             |

4. Amostras de Água Superficial:

Limite de Detecção Cafeína (LOD): 2,2 ng L<sup>-1</sup>

Limite de Quantificação Cafeína (LOQ): 8,5 ng L<sup>-1</sup>

Limite de Detecção Diclofenaco (LOD): 1,0 ng L<sup>-1</sup>

Limite de Quantificação Diclofenaco (LOQ): 7,4 ng L<sup>-1</sup>

5. Amostras de Sedimento (Valores aproximados):

Limite de Detecção Cafeína (LOD): 2,2 ng g<sup>-1</sup>

Limite de Quantificação Cafeína (LOQ): 8,5 ng g<sup>-1</sup>

Limite de Detecção Diclofenaco (LOD): 1,0 ng g<sup>-1</sup>

Limite de Quantificação Diclofenaco (LOQ): 7,4 ng g<sup>-1</sup>