

Análise das alterações de biomoléculas causadas pela exposição ao fármaco diclofenaco sódico em peixes da espécie *Brycon Opalinus* utilizando a espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Analysis of biomolecular changes caused by exposure to the drug diclofenac sodium in fish of the *Brycon Opalinus* species using Fourier transformed infrared spectroscopy (FTIR)

Análisis de los cambios en las biomoléculas causados por la exposición al fármaco diclofenaco sódico en peces de la especie *Brycon opalinus* mediante espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

Recebido: 03/10/2022 | Revisado: 16/10/2022 | Aceitado: 19/10/2022 | Publicado: 24/10/2022

Vanessa Fernandez Banhara

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8830-8875>
Universidade Vale do Paraiba, Brasil
E-mail: vanessabanhara@yahoo.com.br

Andriele Maisa de Oliveira Mello

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3569-7165>
Universidade Vale do Paraiba, Brasil
E-mail: andriele.m.mello@hotmail.com

Lucas Ferreira Lyra

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5229-6566>
Universidade Vale do Paraiba, Brasil
E-mail: lucasferrerialyra@gmail.com

Maria Regina de Aquino Silva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7735-921X>
Universidade Vale do Paraiba, Brasil
E-mail: mregina@univap.br

Kumiko Koibuchi Sakane

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7524-5473>
Universidade Vale do Paraiba, Brasil
E-mail: kumiko.sakane@gmail.com

Resumo

O aumento no consumo de medicamentos em todo mundo tem gerado vários estudos sobre os impactos causados pelo descarte inadequado de resíduos que contenham os princípios ativos dos medicamentos no meio ambiente. Após serem ingeridos, estes medicamentos são excretados na forma de outros compostos no esgoto doméstico, que vários ainda são persistentes no ambiente e geram alterações fisiológicas em organismos aquáticos. Devido ao crescimento populacional e o consumo excessivo, o anti-inflamatório conhecido como diclofenaco sódico, está entre os principais medicamentos encontrados nas águas superficiais brasileiras, em concentrações na faixa de micrograma por litro ($\mu\text{g.L}^{-1}$). Este trabalho teve como objetivo estudar as alterações biomoleculares que o diclofenaco pode gerar em peixes da espécie *Brycon opalinus*, utilizando a técnica de Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) acoplada aos métodos quimiométricos, a análise de componentes principais (PCA) e a análise de agrupamento hierárquico (HCA). Foram estudadas duas diferentes concentrações de diclofenaco mais o controle. O órgão selecionado para ser estudado foram as brânquias. Os resultados de PCA e HCA mostraram a discriminação entre os espectros de controle e tratados. A análise quantitativa através do cálculo das áreas das bandas de lipídios, proteínas e carboidratos mostrou alterações nestas biomoléculas, sendo que proteínas e carboidratos são mais sensíveis a exposição ao diclofenaco. Os resultados de deconvolução e ajuste de curvas mostraram a diminuição de estrutura desordenada e aumento de β folha da estrutura secundária de proteína para a exposição de $4,4 \mu\text{g.L}^{-1}$ de diclofenaco.

Palavras-chave: Espectroscopia vibracional no infravermelho médio; *Brycon opalinus*; Ecotoxicidade; Fármacos; Meio ambiente.

Abstract

The increase in the consumption of medicines around the world has generated several studies on the impacts caused by the inappropriate disposal of waste containing the active ingredients of medicines in the environment. After being

ingested, these drugs are excreted in the form of other compounds in domestic sewage, many of which are still persistent in the environment and generate physiological changes in aquatic organisms. Due to population growth and excessive consumption, the anti-inflammatory known as diclofenac sodium is among the main drugs found in Brazilian surface waters, in concentrations in the range of micrograms per liter ($\mu\text{g.L}^{-1}$). This work aimed to study the biomolecular changes that diclofenac can cause in fish of the *Brycon opalinus* species, using the Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) technique coupled with chemometric methods, principal component analysis (PCA) and hierarchical cluster analysis (HCA). Two different concentrations of diclofenac sodium plus the control were studied. The organ selected for this study were the gills. PCA and HCA results showed discrimination between the control and treated spectra. The quantitative analysis, by calculating the areas of the bands of lipids, proteins and carbohydrates, showed changes in these biomolecules, with proteins and carbohydrates being more sensitive to exposure to diclofenac. The results of the deconvolution and curve fitting showed a decrease in the disordered structure and an increase in β sheet of the protein secondary structure for the exposure of $4.4 \mu\text{g.L}^{-1}$ of diclofenac.

Keywords: Infrared spectroscopy; *Brycon opalinus*; Ecotoxicity; Drugs; Environment.

Resumen

El aumento del consumo de medicamentos en el mundo generó varios estudios sobre los impactos causados por la eliminación inadecuada de residuos que contienen los principios activos de los medicamentos en el medioambiente. Tras ingerirlos, estos fármacos son excretados como otros compuestos en las aguas residuales domésticas, varios aún persisten en el ambiente y generan cambios fisiológicos en los organismos acuáticos. Debido al crecimiento poblacional y su consumo excesivo, el antiinflamatorio diclofenaco sódico está entre los principales fármacos encontrados en las aguas superficiales brasileñas en concentraciones en el orden de microgramos por litro ($\mu\text{g.L}^{-1}$). Este trabajo tuvo como objetivo estudiar las alteraciones biomoleculares que este medicamento puede generar en los peces de la especie *Brycon opalinus*, utilizando la técnica de espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) acoplada a métodos quimiométricos, análisis de componentes principales (PCA) y análisis de clúster jerárquico (HCA). Se analizaron dos concentraciones diferentes del fármaco más el control. El órgano seleccionado para el análisis fueron las branquias. Los resultados del PCA y HCA mostraron la distinción entre los espectros de control y los tratados. El análisis cuantitativo mediante el cálculo de las áreas de las bandas de lípidos, proteínas y carbohidratos mostró cambios en estas biomoléculas, siendo las proteínas y los carbohidratos más sensibles a exposición al diclofenaco. Los resultados de la deconvolución y ajuste de la curva mostraron disminución de la estructura desordenada y aumento de la hoja β de la estructura secundaria de la proteína para la exposición de $4,4 \mu\text{g.L}^{-1}$ de diclofenaco.

Palabras clave: Espectroscopia vibracional en el infrarrojo medio; *Brycon opalinus*; Ecotoxicidad; Fármacos; Medioambiente.

1. Introdução

1.1 Impactos da Poluição nos Recursos Hídricos

Com o aumento da população, tem-se também o aumento do volume de efluentes domésticos gerados. Consequentemente, o lançamento de esgoto *in natura* e de efluentes tratados em Estações de Tratamento de Esgoto (ETE) são as principais fontes de contaminação por resíduos contendo princípios ativos presente em medicamentos, uma vez que os tratamentos convencionais não eliminam totalmente estes compostos (Miranda et al., 2018).

De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2019), no Brasil, devido à precariedade da estrutura sanitária de tratamento de esgotos, estima-se que há uma grande quantidade de resíduo de fármacos não removidos nos sistemas pluviais, sendo que dados revelam que 39,7% dos municípios brasileiros não possuem serviço de coleta de esgoto e apenas 68,3% dos domicílios são atendidos por rede geral de esgotos nos municípios que possuem o sistema.

A presença e os efeitos adversos dos compostos farmacêuticos no ambiente aquático começaram a receber maior atenção da imprensa popular e científica nos últimos anos. Este fato se deve a um elevado número de trabalhos publicados na década de 90, na qual foram relatados diferentes níveis de produtos farmacêuticos em ambientes aquáticos, incluindo águas subterrâneas, superficiais e residuais, efluentes de esgoto e até mesmo em água potável, principalmente nos países europeus (Bound & Voulvoulis, 2005; Szymańska et al., 2019; Santos et al., 2021).

A determinação da presença de resíduos farmacêuticos em águas superficiais, subterrâneas e para abastecimento, tem sido alvo de diversos estudos, entre eles alguns realizados no Brasil (Kramer et al., 2015; Ghelfi et al., 2016; Americo-Pinheiro

et al., 2017; Guiloski et al., 2017; Bisognin et al., 2018; Escher et al., 2019; Salgado et al., 2019; Szymańska et al., 2019; Salgado et al., 2021). Dentre esses resíduos farmacêuticos destaca-se o diclofenaco sódico (nome IUPAC: Ácido 2-[2-(2,6-diclorofenil)amino]benzoacético, um anti-inflamatório que apresenta elevado consumo em todo mundo, sendo que apenas 35% do composto é absorvido pelo organismo e o restante é excretado pela urina (Bound & Voulvoulis, 2005; Hanif et al., 2020; Ashfaq et al., 2017a, b; Aguiar & Machado, 2022).

Este medicamento teve concentrações detectadas em diversas análises realizadas em águas superficiais (Bisognin et al., 2018; Escher et al., 2019). Foram encontradas nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul e Paraná, concentrações na faixa de ngL^{-1} - μgL^{-1} , do fármaco no esgoto bruto e no tratado e em água bruta (Américo-Pinheiro et al., 2017; Escher et al., 2019; Sousa et al., 2020).

De maneira geral, os fármacos podem ser biotransformados por diferentes processos, que normalmente ocorrem no fígado, têm como objetivo comum, facilitar a excreção dos fármacos que foram ingeridos (Patel et al., 2016). Para muitos fármacos, a biotransformação ocorre em 2 fases, sendo que, na fase I, tem-se a formação de um novo grupo funcional (oxidação, redução, hidrólise) e, na fase II, tem-se a conjugação com alguma substância endógena, como por exemplo, o ácido glucurônico, o sulfato e a glicina (Patel et al., 2016; Pan, 2019).

A biotransformação do diclofenaco ocorre, parcialmente, por glicuronidação da molécula intacta e, principalmente, por hidroxilação e metoxilação simples e múltipla, resultando em vários metabólitos fenólicos como 4'-hidroxiclofenaco (2-[2,6-dicloro-4 ácido hidroxifenilamino] feniletanoico) (30%) além de outros metabólitos importantes como 5'-hidroxiclofenaco (2-[2,6-diclorofenilamino]-5-ácido hidroxifeniletanoico) (10%), 3'-hidroxiclofenaco (2-[2,6-ácido dicloro-3-hidroxifenilamino] feniletanoico) e 4',5-dihidroxiclofenaco (2-[2,6-dicloro-4-hidroxifenilamino]-5-ácido hidroxifeniletanoico) (15%) o quais, em sua maioria, são convertidos a conjugados glicurônicos (Lonappan et al., 2016).

Portanto, a ocorrência de metabólitos humanos de diclofenaco em água e a semelhança estrutural identificada em relação ao fármaco original reforçam a importância de se compreender melhor os seus efeitos de toxicidade. (Lonappan et al., 2016).

O estudo da ecotoxicologia visa entender e prever efeitos de substâncias químicas em seres vivos e comunidades naturais, estabelecendo alertas para a identificação de substâncias ou agentes que representem risco e sugerindo a aplicação de medidas preventivas antes que ocorram grandes danos aos ecossistemas (Evariste et al., 2019; Shane, 2019).

Os indicadores fisiológicos e comportamentais são frequentemente utilizados na avaliação dos impactos causados pelos agentes tóxicos nas populações (Guiloski et al., 2017; Szymańska et al., 2019; Gonzalez et al., 2021; Pereira et al., 2021; Salgado et al., 2021). Uma grande variedade de danos causados pelos agentes tóxicos pode ser observada nos organismos, como por exemplo, as alterações histológicas e morfológicas na estrutura óssea, no fígado, nos rins e em outros órgãos (Derakhsh et al., 2020; Matouke, 2019).

Muitas pesquisas que têm como base o estudo de lesões e necroses em tecidos, têm sido utilizadas como o fundamento teórico de muitas pesquisas (Meletti et al., 2003; Simonato et al., 2016; Vieira et al., 2016; Abdel-Gawad et al., 2018; Lunardelli et al., 2018; Kumar et al., 2020).

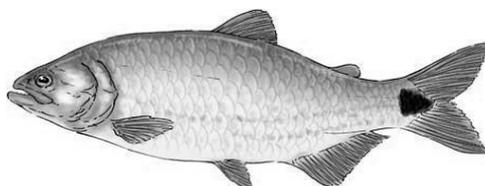
Nos testes de toxicidade podem ser observados efeitos agudos e efeitos crônicos, sendo os primeiros àqueles que ocorrem rapidamente como um resultado da exposição ao agente tóxico por um curto período de tempo (para peixes, esse período pode ser horas, dias ou até mesmo semanas) (Meletti et al., 2003; Kumar et al., 2020).

1.2 *Brycon opalinus* - Pirapitinga-do-Sul: espécie endêmica do Rio Paraíba do Sul e ameaçada de extinção

O peixe *Brycon opalinus* (Figura 1), conhecido popularmente como Pirapitinga do Sul e apreciado no consumo humano, é uma espécie endêmica dos rios de cabeceiras da bacia do Paraíba do Sul (Hilsdorf & Petrere Jr., 2002). Esta bacia está localizada

no extremo norte da área de floresta ombrófila densa no sudeste do Brasil, e, em geral, a região tem uma alta porcentagem de espécies de peixes endêmicas (Gomiero & Braga, 2007).

Figura 1 - Espécie *Brycon opalinus* (Pirapitinga do Sul).



Fonte: Hilsdorf & Petrere Jr. (2002).

A espécie *B. opalinus* é uma espécie de pequeno porte que se reproduz continuamente ao longo do ano, tem fácil adaptação às condições experimentais e encontra-se na categoria de espécies vulneráveis, sendo assim, declarada como espécie ameaçada de extinção, segundo o Diário Oficial da União de 21 de maio de 2004, status este que se mantém até o presente momento. Por causa da sua baixa resiliência a alterações ambientais, a sobrevivência desta espécie está fortemente relacionada com a qualidade ambiental, em especial, com a qualidade da água e manutenção das matas ciliares que minimizam a degradação e assoreamento dos leitos dos rios (Gomiero & Braga, 2007).

Assim, considerando as alterações moleculares evidenciadas por contaminantes hídricos em diversos estudos envolvendo espécies da ictiofauna (Abdel-Gawad et al., 2018; Lunardelli et al., 2018; Kumar et al., 2020), bem como o nível de degradação ambiental da qualidade das águas do Rio Paraíba do Sul e a alta sensibilidade a contaminantes ambientais da espécie *B. opalinus*, o presente trabalho teve como objetivo identificar as alterações causadas pela exposição do fármaco diclofenaco nos constituintes biomoleculares dos tecidos de brânquias de *B. opalinus*, utilizando-se da técnica espectroscópica no infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) associada aos métodos quimiométricos. FTIR é uma técnica rápida e simples para analisar as alterações moleculares em amostras biológicas. Fatores bioquímicos tais como proteínas, lipídios e carboidratos são muito sensíveis e são usados para detecção de condições de estresse (Kumar et al., 2020). O órgão escolhido neste trabalho foram as brânquias, pois elas são consideradas como biomarcadoras que indicam as condições ambientais aquáticas por estarem em contato direto e permanente com contaminantes da água. Como possuem uma ampla área de contato com os contaminantes, as brânquias respondem sensivelmente a exposição a contaminantes mesmo em uma baixa concentração (Pereira et al., 2020; Castro et al., 2018; Batista, et al., 2018).

2. Metodologia

2.1 Obtenção dos animais

Os peixes da espécie *Brycon opalinus* em estágio juvenil, foram cedidos pela Estação de Piscicultura da Companhia Energética de São Paulo – CESP da Usina Hidrelétrica de Paraibuna. Após coletados, os animais foram transportados para o Laboratório de Ciências Ambientais, no Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IP&D) da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP). O estudo foi realizado após a aprovação do projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba (A11/CEUA/2014).

Considerando que a contaminação das águas naturais por diclofenaco, bem como por outros fármacos, se dá pela disposição inadequada desses fármacos na forma de comprimidos, optou-se pela utilização de comprimidos adquiridos comercialmente em farmácias para realizar os ensaios de toxicidade. Utilizou-se um total de 20 comprimidos revestidos de diclofenaco, com uma concentração de 50 mg por comprimido.

As concentrações utilizadas neste trabalho foram 2,2 e 4,4 $\mu\text{g L}^{-1}$, e sua seleção foi baseada na experimentação inicial para o estudo do efeito toxicológico do fármaco diclofenaco sobre a sobrevivência da fauna ictiológica *Danio rerio* (Banhara et al., 2013).

Os comprimidos foram macerados em um almofariz de Ágar até ficarem com uma aparência homogênea. Em seguida, foram pesadas as quantidades necessárias do fármaco, em gramas, para cada uma das duas concentrações, em balança analítica digital AL 500 Marte, para um volume total de 20 L de água por aquário. Foram preparados um total de nove aquários, sendo que, três eram para o grupo controle e seis eram para os grupos tratados. O fármaco foi solubilizado previamente em água de ensaio (água mineral) e adicionado ao sistema completando assim, o volume e a concentração de fármaco final pretendido para cada condição.

2.2 Desenho experimental

Foram utilizados no trabalho cinquenta e quatro peixes da espécie *Brycon opalinus* em estágio juvenil, machos e fêmeas, com um peso médio de 8 g e um tamanho médio de 8,5 cm todos eles foram mantidos no laboratório de Ciências Ambientais do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IP&D)/UNIVAP, de acordo com os princípios éticos descritos na ABNT NBR 15499/2007 e CETESB / L5.019 – II.

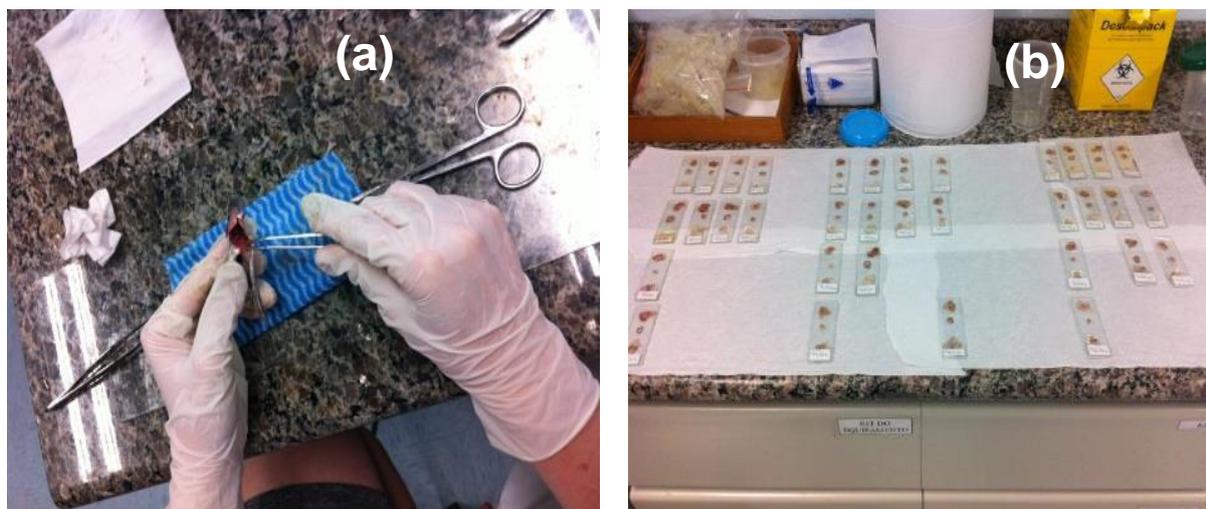
Os animais permaneceram em aquários submetidos à temperatura média de 27 °C e alimentados com ração comercial granulada 38 % de proteína, considerando fotoperíodo cuja variação foi de 12 horas de luz e 12 horas de escuro. Os animais foram divididos igualmente em três grupos de aquários, todos em triplicata e com seis peixes em cada aquário, totalizando nove aquários com capacidade de 20 L, providos de aeradores para oxigenação da água, onde foram submetidos à aclimação por um período de uma semana, com monitoramento diário dos parâmetros oxigênio dissolvido, pH, condutividade e temperatura da água. A alimentação foi interrompida 24 horas antes do início dos experimentos.

O efeito do fármaco sobre as biomoléculas de *B. opalinus* foi avaliado após 24 horas de exposição às diferentes concentrações de diclofenaco, com monitoramento (a cada hora) de parâmetros como oxigênio dissolvido ($6,20 \pm 0,8 \text{ mg.L}^{-1}$), pH ($7,20 \pm 0,5$), condutividade ($16,45 \pm 0,4 \mu\text{S.cm}^{-1}$) e temperatura ($23 \pm 1,0 \text{ }^\circ\text{C}$) da água por sonda multiparâmetros *Pionner 65 - Radiometer Analytical*.

2.3 Obtenção do material biológico e preparo das amostras para análise

Após 24 horas de exposição ao fármaco, um indivíduo por aquário foi eutanasiado conforme procedimentos estabelecidos pelo comitê de ética e experimentação animal, considerando a imersão do animal em solução de benzocaína, pH 7,0 por 10 minutos (Conselho Federal de Medicina Veterinária, 2012). Para a avaliação das respostas biomoleculares foram retiradas as brânquias de cada animal por conta da função do órgão na destoxificação de drogas (Figura 2).

Figura 2 - (a) Retirada do material biológico; (b) Preparo das lâminas de vidro.



Fonte: Autores.

As amostras foram acomodadas em lâminas de vidro e posteriormente congelados a $-6\text{ }^{\circ}\text{C}$. Em seguida, foram submetidas à liofilização no *Concentrator Plus* com a função: *dessicator /D-AQ (dessicator-aqueaus)*, por 20 horas.

As médias dos espectros, que foram obtidos em triplicata, para cada peixe eutanasiado, foram obtidas na região de 4000 a 500 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1} com 32 varreduras à temperatura controlada de $20\text{ }^{\circ}\text{C}$. O espectrofotômetro utilizado foi o *Spectrum Spotlight 400* com Transformada de Fourier (FT-IR), tecnologia de refletância total atenuada (ATR) da PerkinElmer. Os espectros foram processados com o *software Spectrum 5.3 e 10.5 (PerkinElmer)*, onde foram realizadas as correções de linha de base, a suavização espectral com o algoritmo *Savitsky Golay* (9 pontos), a normalização e a plotagem em absorbância.

Os espectros processados com o *software Spectrum 5.3 e 10.3* foram plotados em gráficos utilizando o *software Origin Pro 8.5*. A grande quantidade de dados foi submetida a análise de componentes principais (*Principal Component Analysis - PCA*) utilizando o *software MiniTab 17* para reduzir o conjunto de dados à menor matriz ortogonal por meio da covariância dos dados (Bro & Smilde, 2014). A matriz obtida foi então submetida a análise hierárquica de grupo (*Hierarchical Cluster Analysis - HCA*) para classificar as variáveis em grupos de acordo com a similaridade estatística dos componentes avaliados (Grasel et al., 2016). Para a análise de agrupamento, foram utilizados os seguintes parâmetros: a distância euclidiana para a medida de similaridade; como algoritmo para agrupamento hierárquico, o método de Ward é conhecido como o método da mínima variância, permite agrupar os clusters de forma a produzir o mínimo de aumento de variância.

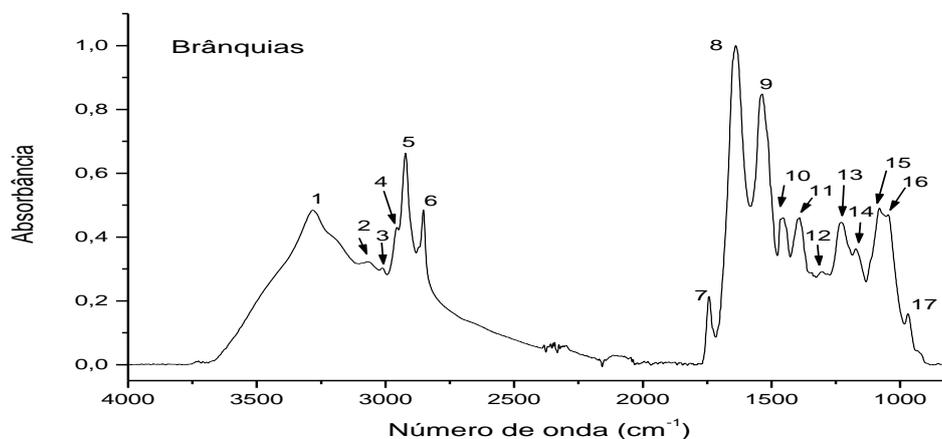
3. Resultados e Discussão

Após 96 horas, todos os peixes tratados remanescentes morreram e apenas os peixes remanescentes do grupo controle permaneceram vivos e saudáveis.

3.1 Obtenção dos espectros infravermelhos de brânquias de grupos controle e tratados

O espectro infravermelho médio e normalizado de brânquias de *Brycon opalinus* é mostrado na Figura 3.

Figura 3 - Espectro infravermelho de brânquias de *Brycon opalinus*.



Fonte: Autores.

Os espectros infravermelhos das brânquias indicam a presença de constituintes biomoleculares tais como lipídios (2955, 2922 e 2852 cm^{-1}) proteínas (1639 e 1535 cm^{-1}), carboidratos (1173, 1081 e 1046 cm^{-1}) e ácidos nucleicos (1230 cm^{-1}). Na região de aproximadamente 1450 a 1100 cm^{-1} muitos modos vibracionais de biomoléculas principalmente proteínas e lipídios, sobrepõem-se, dificultando a identificação. Na região de 1150 a 1000 cm^{-1} são observadas as absorções de modos vibracionais sobrepostos de fosfatos e de carboidratos.

Os espectros infravermelhos de proteínas apresentam absorções associadas com grupo amida que é unidade estrutural comum.

No estudo de biomoléculas, são particularmente importantes as investigações sobre as proteínas, os polipeptídios e os aminoácidos. O arranjo de aminoácidos em uma cadeia de proteína tem um efeito direto no esqueleto do grupo de polipeptídios, que determina a frequência de vibrações da região $-\text{CONH}-$. Estas vibrações são observadas nos espectros vibracionais das proteínas.

A banda da amida I centrada em 1639 cm^{-1} corresponde a 80 % da vibração de estiramento da ligação $\text{C}=\text{O}$ acoplado aos modos vibracionais de deformações no plano da ligação $\text{N}-\text{H}$ (10 %) e de estiramento da ligação $\text{C}-\text{N}$ (10 %).

A banda da amida II centrada em 1535 cm^{-1} corresponde a 60 % da vibração da deformação $\text{N}-\text{H}$ e 40 % de estiramento $\text{C}-\text{N}$.

Os picos visualmente identificados são numerados para realização das atribuições de bandas mostradas na Tabela 1, sendo que, as atribuições das bandas nos espectros infravermelhos foram realizadas a partir dos compostos semelhantes que existem na literatura (Kumar et al., 2020; Velmurugan et al., 2018; Barbosa, 2007; Moyasaghi, 2008).

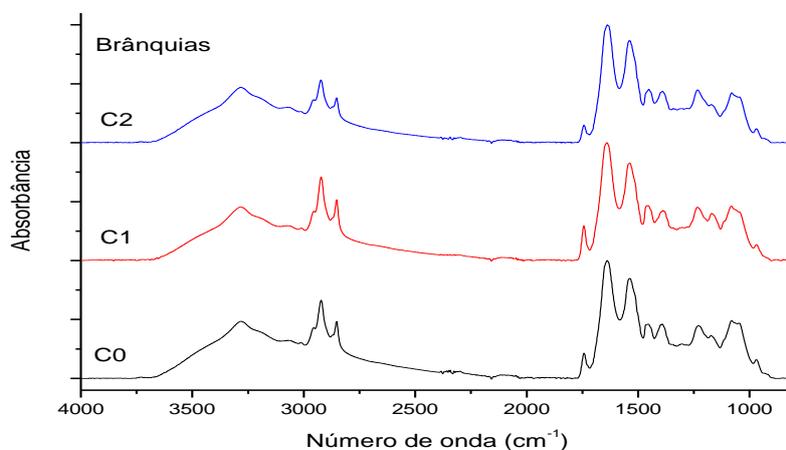
Tabela 1 - Modos vibracionais e atribuições aproximadas do espectro infravermelho das brânquias.

Nº	Número de onda (cm ⁻¹)	Modos vibracionais e atribuições aproximadas
1	3282	Estiramento da ligação N-H (Amida A de proteínas e ácidos nucleicos)
2	3064	Estiramento da ligação N-H (Amida B de proteína e ácidos nucleicos)
3	3011	Estiramento da ligação =C-H (relacionado as bandas olefínicas e ácidos graxos)
4	2955	Estiramento assimétrico da ligação C-H em -CH ₃ (principalmente em lipídios)
5	2922	Estiramento assimétrico da ligação C-H em -CH ₂ - (principalmente em lipídios)
6	2852	Estiramento simétrico da ligação C-H em -CH ₃ (lipídios, ácidos graxos, proteínas)
7	1743	Estiramento de C=O do grupo éster (lipídios, ácidos graxos, triglicerídeos)
8	1639	Estiramento da ligação C=O, estiramento da ligação C-N, deformação da ligação N-H (Amida I de proteína)
9	1535	Deformação angular N-H, estiramento da ligação C-N (Amida II de proteína)
10	1464	Deformação angular em -CH ₃ e em -CH ₂ - (lipídio, proteínas)
11	1398	Estiramento simétrico de COO ⁻ (ácidos graxos, aminoácidos)
12	1303	Estiramento C-N, deformação N-H, estiramento C=O, deformação O=C-N (Amida III de proteína)
13	1230	Estiramento assimétrico de PO ₂ ⁻ (ácido nucleico)
14	1173	Estiramento das ligações C-O e CC e deformação C-O-H (carboidratos)
15	1081	Estiramento de C-C e C-O e deformação C-O-H de glicogênio
16	1046	Estiramento C-O (polissacarídeo)
17	970	Forma Z-DNA

Fontes: Kumar et al. (2020); Velmurugan et al. (2018); Barbosa (2007); Movasaghi (2008).

Os espectros infravermelhos médios das brânquias do Grupo 1 (controle, indicado por C0), do Grupo 2 (exposto a concentração de 2,2 µg.L⁻¹ de diclofenaco, indicado por C1) e do Grupo 3 (exposto a concentração de 4,4 µg.L⁻¹ de diclofenaco, indicado por C2) são mostrados na Figura 4.

Figura 4 - Espectros infravermelhos de brânquias do grupo de controle, C0, e dos grupos tratados, C1 e C2, que foram expostos a concentrações de 2,2 µg.L⁻¹ e 4,4 µg.L⁻¹ de diclofenaco, respectivamente.



Fonte: Autores.

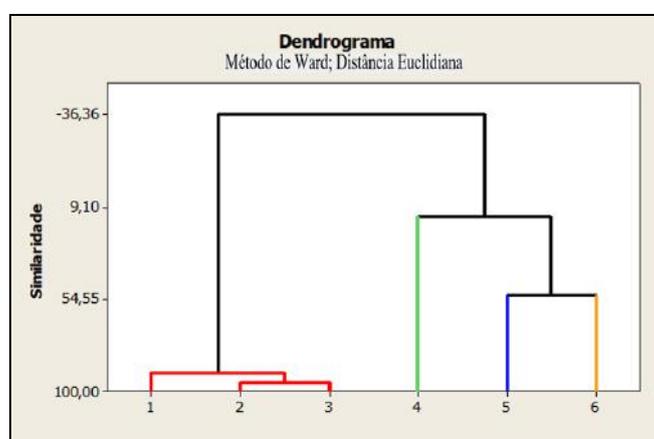
3.2 Análises de componentes principais (PCA) e de agrupamentos hierárquicos (HCA) dos grupos controle e tratados

Visualmente, as diferenças espectrais das brânquias, com a exposição de concentrações diferentes de diclofenaco, são difíceis de serem observadas. A área das bandas e o número de picos se assemelham, porém observam-se algumas diferenças nas intensidades e nos contornos das bandas. Torna-se necessário o uso de cálculos matemáticos e estatísticos para discutir o grau de semelhança dos espectros. Os métodos quimiométricos de Análises de Componentes Principais (PCA) e de Agrupamento Hierárquico (HCA) foram utilizados para discriminar os espectros dos grupos de controle (C0) e dos grupos tratados, C1 e C2.

As regiões de 3000 a 2800 cm^{-1} e 1800 a 800 cm^{-1} foram utilizadas para obtenção dos dendrogramas.

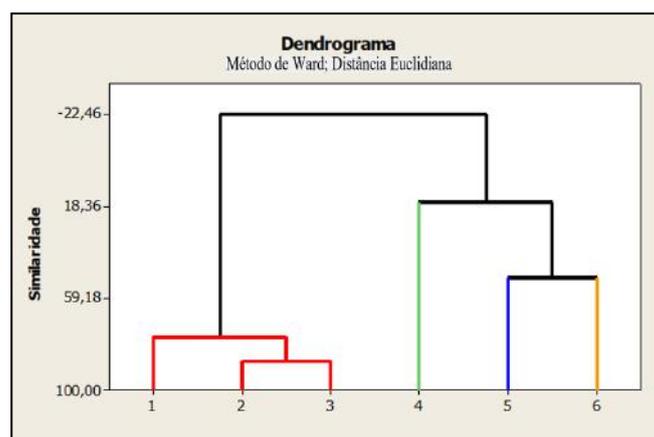
As amostras expostas as concentrações de 2,2 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e 4,4 $\mu\text{g.L}^{-1}$, foram comparadas aos espectros das amostras do controle, formando C0xC1 e C0xC2, que estão apresentados nas Figuras 5 e 6, respectivamente.

Figura 5 - Dendrogramas dos espectros de C0xC1 na região de 3000 a 2800 cm^{-1} e 1800 a 800 cm^{-1} .



Fonte: Autores.

Figura 6 - Dendrogramas dos espectros de C0xC2 na região de 3000 a 2800 cm^{-1} e 1800 a 800 cm^{-1} .



Fonte: Autores.

Os resultados do HCA mostram a discriminação entre os grupos de controle e os tratados. Os graus de similaridades são mostradas na Tabela 2.

Tabela 2 - Resultados de HCA de C0xC1 na região de 3000 a 2800 e 1800 a 800 cm⁻¹.

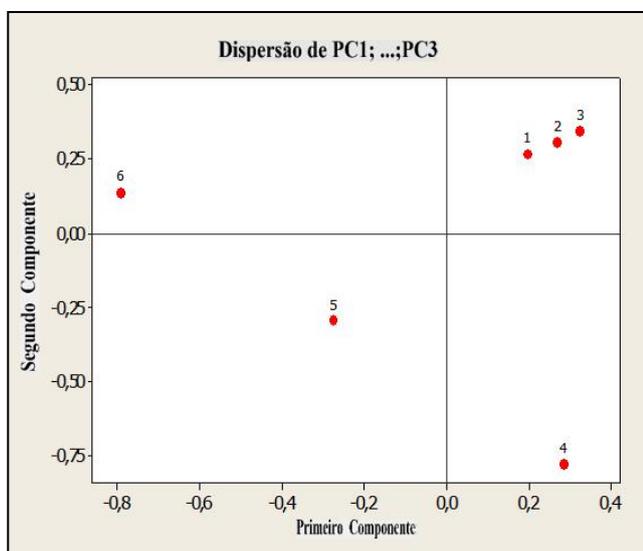
Comparação C0xC1		Comparação C0xC2	
Spectra	Similaridade	Spectra	Similaridade
2,3	95,38	2,3	87,22
1, (2,3)	90,70	1,(2,3)	76,56
5,6	52,35	5,6	50,17
4(5,6)	14,32	4,(5,6)	16,51
[1,(2,3)] e [4,(5,6)]	-36,36	[1,(2,3)] e [4,(5,6)]	-22,46

Fonte: Autores.

O número negativo de similaridade indica que não há semelhança entre os espectros. As linhas mais próximas ao eixo horizontal mostram maior semelhança entre os espectros.

O gráfico de dispersão de pontuação (*Score scatter plot*) obtido pelo PCA é apresentado nas Figuras 7 e 8. Os resultados mostram o nível de discriminação entre os grupos C0 e C1 na Figura 7 e entre os grupos C0 e C2 na Figura 8. Os espectros do grupo controle (C0) se agrupam mais próximos que os dos grupos tratados (C1 e C2), que se espalham com uma maior distância. Para o C0xC1, o PC1 contribuiu com 99,3 % de variação e o PC2, 0,7 % de variação e para o C0xC2, o PC1 contribuiu com 99,4 % de variação e o PC2, 0,65% de variação.

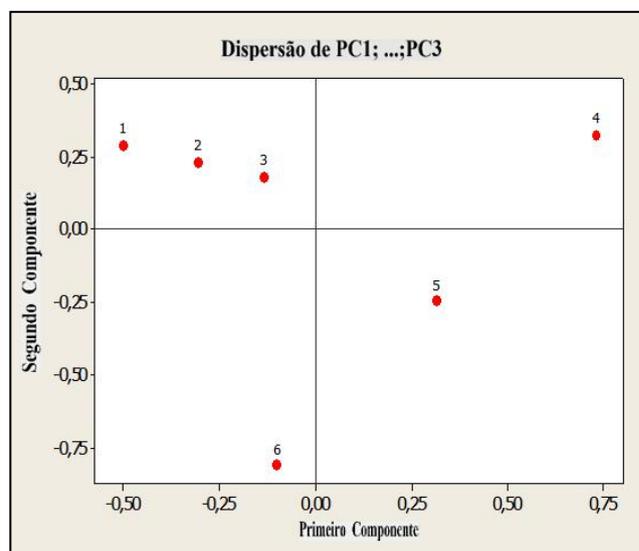
Figura 7 – Dispersão de pontuação C0xC1.



Legenda: 1,2,3 (C0); 4,5,6 (C1).

Fonte: Autores.

Figura 8 - Dispersão de pontuação C0xC2.



Legenda: 1,2,3 (C0); 4,5,6 (C2).

Fonte: Autores.

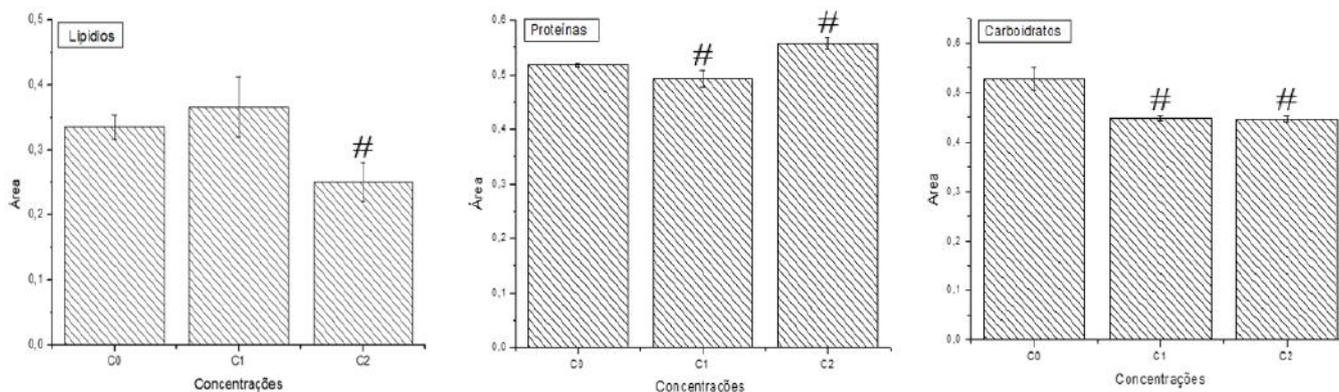
3.3 Cálculo das áreas das bandas de lipídios, proteínas e carboidratos

As alterações espectrais são consideradas como parâmetros bioquímicos para indicação do grau de toxicidade. (Kumar et al., 2020). Assim, as alterações de biomarcadores, como por exemplo, os lipídios, as proteínas, os ácidos nucleicos e os carboidratos podem ser utilizados como indicadores nos testes de toxicidade (Hu et al., 2017), sendo que, as proteínas e a glicose são extremamente sensíveis e são usados para a detecção da condição de estresse (Kumar et al., 2020).

As alterações espectrais nas regiões dos lipídios (3000 a 2800 cm^{-1}), dos carboidratos (1100 a 1000 cm^{-1}) e da amida (1700 a 1600 cm^{-1}) são consideradas como parâmetros para avaliação do grau de toxicidade por exposição a poluentes (Kumar et al., 2020; de Magalhães, 2020).

Neste trabalho, as áreas relativas foram obtidas calculando as áreas das regiões de 2987 a 2880 cm^{-1} , de 1579 a 1477 cm^{-1} e 1131 a 1000 cm^{-1} e depois, dividindo essas áreas pelas áreas da amida I. A Tabela 3 e a Figura 9 mostram os valores médios de área com desvio padrão, que foram analisados utilizando o teste t, com um nível de significância (p) de $p < 0,05$.

Figura 9 - Média das áreas calculadas, com desvio padrão, de lipídios, proteínas e carboidratos do grupo de controle, C0, e dos grupos tratados, C1 e C2, que foram expostos a concentrações de 2,2 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e 4,4 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de diclofenaco, respectivamente.



Nota. # → grupos que apresentaram uma diferença estatisticamente significativa, quando comparados ao grupo controle (C0), utilizando um nível de significância (p) de $p < 0,05$. Fonte: Autores.

Tabela 3 - Valores médios das áreas, com desvio padrão, de lipídios, proteínas e carboidratos do grupo de controle, C0, e dos grupos tratados, C1 e C2, que foram expostos a concentrações de 2,2 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e 4,4 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de diclofenaco, respectivamente.

Grupo	Lipídios	Proteínas	Carboidratos
	Área \pm Desvio Padrão	Área \pm Desvio Padrão	Área \pm Desvio Padrão
C0	0,33517 \pm 0,019	0,51833 \pm 0,003	0,5269 \pm 0,023
C1	0,36630 \pm 0,046	0,49313 \pm 0,015	0,44743 \pm 0,005
C2	0,25077 \pm 0,030	0,55787 \pm 0,011	0,44637 \pm 0,005

Fonte: Autores.

Os resultados indicam que nas comparações entre C0 e C1, as variações nas áreas de lipídios não são estatisticamente significativas para $p < 0,05$, no entanto entre C0 e C2 as suas variações são estatisticamente significativas para $p < 0,05$. Portanto as alterações nos lipídios aparecem nas concentrações maiores. Proteínas e Carboidratos mostram diferenças significativas quando comparados ao controle nas duas concentrações com significância $p < 0,05$. A redução das intensidades das bandas dos carboidratos nos grupos tratados sugere a alteração do metabolismo do glicogênio influenciado pela exposição a contaminantes. O consumo de glicogênio pode representar uma utilização de energia atípica, devido ao estresse tóxico que os contaminantes causam no organismo (Kumar et al., 2020).

Os resultados indicam que as proteínas e os carboidratos são mais sensíveis a presença de contaminantes do que os lipídios, corroborando com a literatura (Kumar et al., 2020).

3.4 Deconvolução e ajuste de curva na região de amida I

Observa-se que a área da proteína diminui na concentração C1 e em seguida sua área é aumentada na concentração C2. O estudo das alterações nas estruturas secundárias da proteína é essencial para compreender os componentes das proteínas nas células (Kumar et al., 2020).

O método de deconvolução e ajuste de curva da banda de amida I foram realizados para estimar a estrutura secundária de proteína. Os números de picos e suas posições são obtidos pela técnica de deconvolução e de segunda derivada.

Deconvolução e ajuste de curva na região de 1780 a 1600 cm^{-1} da amida I foram realizadas para analisar os componentes gaussianos da banda da amida I.

A Tabela 4 mostra os resultados do ajuste de curva expresso em função da porcentagem da área das estruturas secundárias da proteína para o controle e os grupos expostos a diferentes concentrações de diclofenaco. Observa-se a diminuição da estrutura desordenada (*random coil*) de 35,65 % para 12,22 % e aumento da formação de β -folha de 41,47 % para 59,74 %. No grupo tratado C2, observa-se a predominância da formação de β -folha mostrada nas Figuras 10 e 11. Este aumento é justificado pela interação da ligação de hidrogênio intermolecular da estrutura β -folha com contaminantes (Kumar et al., 2020). Esses resultados sugerem que as alterações conformacionais nas estruturas secundárias das proteínas foram causadas pela exposição aos contaminantes.

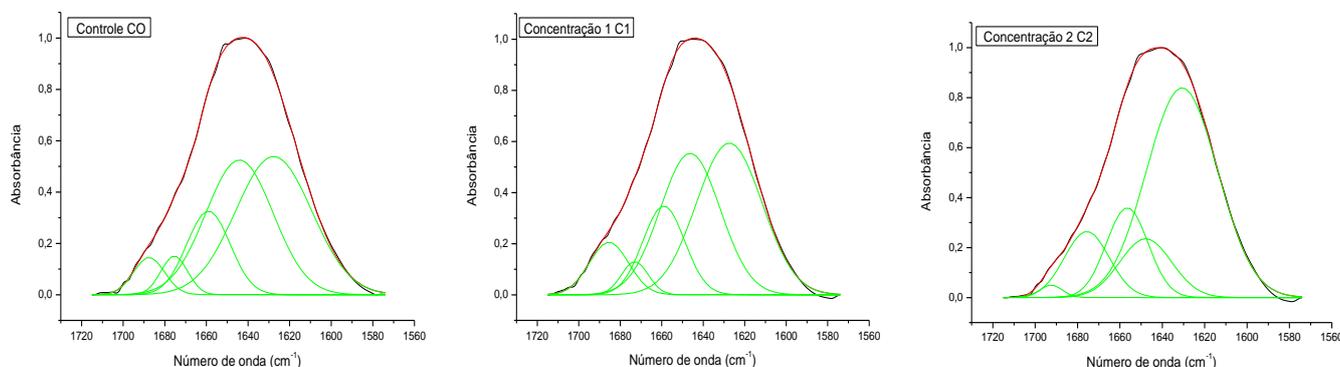
São encontrados dois valores para estrutura β -folha na Tabela 4, 1675 e 1627 cm^{-1} . O número de onda maior poderia ser atribuído a uma estrutura β -folha paralela e o menor, a uma estrutura β -folha antiparalela (Barth, 2007).

Tabela 4 - Porcentagem das áreas da estrutura secundária de proteínas.

Estruturas secundárias	Controle		Concentração 1		Concentração 2	
	Número de onda (cm^{-1})	% Área	Número de onda (cm^{-1})	% Área	Número de onda (cm^{-1})	% Área
voltas	1688	4,54 \pm 0,22	1685	8,22 \pm 0,47	1693	1,13 \pm 0,09
β -folha	1675	4,07 \pm 0,29	1673	3,53 \pm 0,35	1676	2,51 \pm 0,27
α hélice	1659	14,26 \pm 0,48	1659	14,79 \pm 0,55	1657	15,00 \pm 0,37
desordenada	1644	35,65 \pm 0,86	1646	33,87 \pm 1,75	1648	12,22 \pm 0,57
β -folha	1627	41,47 \pm 0,49	1627	39,58 \pm 1,23	1631	59,74 \pm 0,60

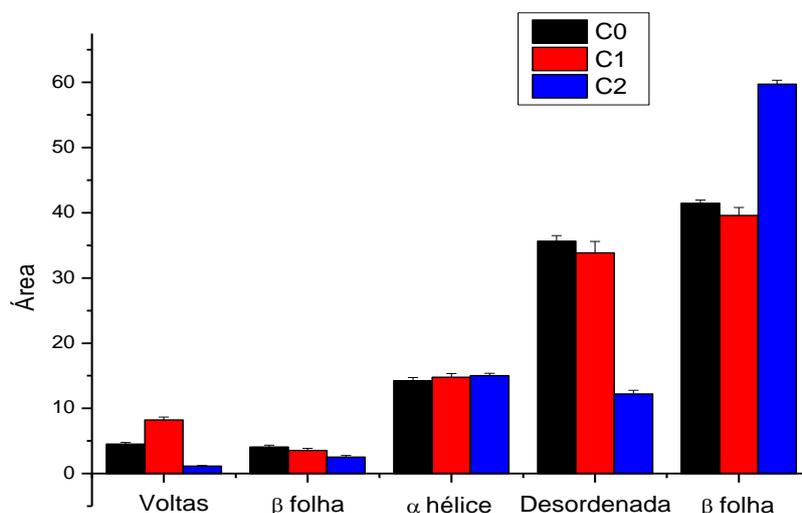
Fonte: Autores.

Figura 10 - Ajuste de curva para grupo de controle, C0, e para os grupos tratados, C1 e C2, respectivamente.



Fonte: Autores.

Figura 11 – Área média, com desvio padrão, das estruturas secundárias de proteína do grupo de controle, C0, e dos grupos tratados, C1 e C2, que foram expostos a concentrações de 2,2 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e 4,4 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de diclofenaco, respectivamente.



Fonte: Autores.

4. Conclusão

Os resultados do PCA e do HCA discriminaram os espectros dos grupos controle e tratados. As alterações espectrais são consideradas como parâmetros bioquímicos para a indicação do grau de toxicidade do meio em que o organismo se encontra.

Alterações nas proteínas e nos carboidratos já podem ser observadas na concentração de 2,2 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de diclofenaco. Já na concentração de 4,4 $\mu\text{g.L}^{-1}$, os lipídios, as proteínas e os carboidratos apresentaram alterações. Sugere-se que as proteínas e os carboidratos são muito sensíveis a presença de contaminantes. Os resultados da deconvolução e do ajuste de curva mostraram que quando o organismo é exposto a um concentração de 4,4 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de contaminante, ocorre uma diminuição da estrutura desordenada e um aumento de β -folha na estrutura secundária da proteína.

A técnica de espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier associada a métodos quimiométricos se mostrou eficiente para o estudo do efeito da toxicidade causada pela exposição a poluentes e pode ser utilizada como uma ferramenta analítica para estudos ambientais, principalmente, por ser uma técnica rápida, precisa e de baixo custo.

Agradecimentos

Os autores agradecem a equipe da Estação de Piscicultura da Companhia Energética de São Paulo (CESP) da Usina Hidrelétrica de Paraibuna, pela gentileza em ceder os peixes para o experimento.

Os autores agradecem a FAPESP pela aquisição do *software Spectrum 10.5* da *PerkinElmer* pelo Processo 2017/04013-0.

Este estudo foi financiado em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Finanças 001.

Referências

- Abdel-Gawad, F. K., Osman, O., Bassem, S. M., Nassar, H. F., Temraz, T. A., Elhaes, H., & Ibrahim, M. (2018). Spectroscopic analyses and genotoxicity of dioxins in the aquatic environment of Alexandria. *Marine pollution bulletin*, 127, 618-625. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.12.056>
- Aguiar, A. P., & Machado, K. M. G. (2022). Biodegradação do Diclofenaco: Uma Revisão. *Leopoldianum*, 48(134).

- Américo-Pinheiro, J. H. P., Isique, W. D., Torres, N. H., Machado, A. A., Carvalho, S. L. D., Valério, W. V., & Ferreira, L. F. R. (2017). Ocorrência de diclofenaco e naproxeno em água superficial no município de Três Lagoas (MS) e a influência da temperatura da água na detecção desses anti-inflamatórios. *Engenharia Sanitária e Ambiental*, 22, 429-435. <https://doi.org/10.1590/S1413-41522017128719>
- Ashfaq, M., Noor, N., Saif-Ur-Rehman, M., Sun, Q., Mustafa, G., Faizan Nazar, M., & Yu, C. P. (2017). Determination of commonly used pharmaceuticals in hospital waste of Pakistan and evaluation of their ecological risk assessment. *CLEAN–Soil, Air, Water*, 45(6), 1500392. <https://doi.org/10.1002/clen.201500392>
- Ashfaq, M., Khan, K. N., Rehman, M. S. U., Mustafa, G., Nazar, M. F., Sun, Q., ... & Yu, C. P. (2017). Ecological risk assessment of pharmaceuticals in the receiving environment of pharmaceutical wastewater in Pakistan. *Ecotoxicology and environmental safety*, 136, 31-39. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.10.029>
- Banhara, V. F. (2013). *Avaliação ambiental dos efeitos causados pelos compostos farmacêuticos Diclofenaco e 17 α -Ethinilestradiol através do teste de Ecotoxicidade em peixes da espécie Danio rerio*. [Trabalho de conclusão de curso]. Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP).
- de Almeida Barbosa, L. C. (2007). *Espectroscopia no infravermelho: na caracterização de compostos orgânicos*. Ed. UFV.
- Barth, A. (2007). Infrared spectroscopy of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1767(9), 1073-1101. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2007.06.004>
- Batista, J. R., Rodrigues, G. Z. P., Rosa Neto, E. D., Gehlen, G., & da Silva, L. B. (2018). Analysis of histopathological abnormalities in the gills of *Astyanax jactuensis* (Characidae) for assessment of water quality in the Ijuí River, southern Brazil. *Acta Toxicológica Argentina*, 26(3), 99-103.
- Bisognin, R. P., Wolff, D. B., & Carissimi, E. (2018). Revisão sobre fármacos no ambiente. *Revista DAE*, 66(210), 78-95. <https://doi.org/10.4322/dae.2018.009>
- Bound, J. P., & Voulvoulis, N. (2005). Household disposal of pharmaceuticals as a pathway for aquatic contamination in the United Kingdom. *Environmental health perspectives*, 113(12), 1705-1711. <https://doi.org/10.1289/ehp.8315>
- Bro, R., & Smilde, A. K. (2014). *Principal component analysis. analytical methods*, v. 6.
- Castro, J. S., França, C. L., Fernandes, J. F. F., Silva, J. S., Carvalho-Neta, R. N. F., & Teixeira, E. G. (2018). Biomarcadores histológicos em brânquias de *Sciades herzbergii* (Siluriformes, Ariidae) capturados no complexo Estuarino de São Marcos, Maranhão. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 70, 410-418. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-9906>
- da Silva Escher, M. A., Américo-Pinheiro, J. H. P., Torres, N. H., & Ferreira, L. F. R. (2019). A problemática ambiental da contaminação dos recursos hídricos por fármacos. *Brazilian Journal of Environmental Sciences (Online)*, (51), 141-148. <https://doi.org/10.5327/Z2176-947820190469>
- de Magalhães, C. R., Carrilho, R., Schrama, D., Cerqueira, M., Rosa da Costa, A. M., & Rodrigues, P. M. (2020). Mid-infrared spectroscopic screening of metabolic alterations in stress-exposed gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Scientific reports*, 10(1), 1-9. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73338-z>
- Derakhsh, M. P., Moradi, M. A., Sharifpour, I., & Jamili, S. (2020). Toxic effects of diclofenac on gills, liver and kidney of *Cyprinus carpio* (Linnaeus, 1758). *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 19(2), 735-747. <https://doi.org/10.22092/ijfs.2018.119517>
- dos Santos Grasel, F., Ferrão, M. F., & Wolf, C. R. (2016). Development of methodology for identification the nature of the polyphenolic extracts by FTIR associated with multivariate analysis. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 153, 94-101. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2015.08.020>
- Evariste, L., Barret, M., Mottier, A., Mouchet, F., Gauthier, L., & Pinelli, E. (2019). Gut microbiota of aquatic organisms: a key endpoint for ecotoxicological studies. *Environmental pollution*, 248, 989-999. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.02.101>
- Ghelfi, A., Ribas, J. L. C., Guiloski, I. C., Bettim, F. L., Piacini, L. D. S., Cestari, M. M., ... & Silva de Assis, H. C. (2016). Evaluation of biochemical, genetic and hematological biomarkers in a commercial catfish *Rhamdia quelen* exposed to diclofenac. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 96(1), 49-54. <https://doi.org/10.1007/s00128-015-1693-3>
- Gomiero, L. M., & Braga, F. M. D. S. (2007). Reproduction of Pirapitinga do Sul (Brycon opalinus Cuvier, 1819) in the Parque Estadual da Serra do Mar-Núcleo Santa Virgínia, São Paulo, Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, 67, 541-549. <https://doi.org/10.1590/S1519-69842007000300021>
- Gonzalez, R. J., Patrick, M. L., Duarte, R. M., Casciato, A., Thackeray, J., Day, N., & Val, A. L. (2021). Exposure to pH 3.5 water has no effect on the gills of the Amazonian tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Journal of Comparative Physiology B*, 191(3), 493-502. <https://doi.org/10.1007/s00360-021-01349-x>
- Guiloski, I. C., Piacini, L. D. S., Dagostim, A. C., de Moraes Calado, S. L., Fávaro, L. F., Boschen, S. L., ... & de 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. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.01.053>
- Hanif, H., Waseem, A., Kali, S., Qureshi, N. A., Majid, M., Iqbal, M., ... & Zafar, M. I. (2020). Environmental risk assessment of diclofenac residues in surface waters and wastewater: a hidden global threat to aquatic ecosystem. *Environmental monitoring and assessment*, 192(4), 1-12. <https://doi.org/10.1007/s10661-020-8151-3>
- Hilsdorf, A. W. S., & Petreire Jr, M. (2002). Conservação de peixes na bacia do rio Paraíba do Sul. *Ciência Hoje*, 30(180), 62-65.
- Hu, L. X., Ying, G. G., Chen, X. W., Huang, G. Y., Liu, Y. S., Jiang, Y. X., ... & Martin, F. L. (2017). Fourier-transform infrared spectroscopy as a novel approach to providing effect-based endpoints in duckweed toxicity testing. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 36(2), 346-353. <https://doi.org/10.1002/etc.3534>

- IBGE - Instituto Brasileiro De Geografia e Estatística. Pesquisa Nacional de Saneamento Básico (PNSB). 2019. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/multidominio/meio-ambiente/9073-pesquisa-nacional-de-saneamento-basico.html?t=destaques>
- Kramer, R. D., Mizukawa, A., Ide, A. H., Marcante, L. O., Santos, M. D., & Azevedo, J. D. (2015). Determinação de anti-inflamatórios na água e sedimento e suas relações com a qualidade da água na bacia do Alto Iguaçu, Curitiba-PR. *Revista Brasileira de Recursos Hídricos*, 20(3), 657-667.
- Kumar, M. M., Kumari, S. B., Kavitha, E., Velmurugan, B., & Karthikeyan, S. (2020). Spectral profile index changes as biomarker of toxicity in *Catla catla* (Hamilton, 1822) edible fish studied using FTIR and principle component analysis. *SN Applied Sciences*, 2(7), 1-10. <https://doi.org/10.1007/s42452-020-3001-z>
- Lonappan, L., Brar, S. K., Das, R. K., Verma, M., & Surampalli, R. Y. (2016). Diclofenac and its transformation products: environmental occurrence and toxicity-a review. *Environment International*, 96, 127-138. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.09.014>
- Lunardelli, B., Cabral, M. T., Vieira, C. E., Oliveira, L. F., Risso, W. E., Meletti, P. C., & Martinez, C. B. (2018). Chromium accumulation and biomarker responses in the Neotropical fish *Prochilodus lineatus* caged in a river under the influence of tannery activities. *Ecotoxicology and environmental safety*, 153, 188-194. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.02.023>
- Matouke, M. M. (2019). FTIR study of the binary effect of titanium dioxide nanoparticles (nTiO₂) and copper (Cu²⁺) on the biochemical constituents of liver tissues of catfish (*Clarias gariepinus*). *Toxicology reports*, 6, 1061-1070. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2019.10.002>
- Meletti, P. C., Rocha, O., & Martinez, C. D. R. (2003). Avaliação da degradação ambiental na bacia do rio Mogi-Guaçu por meio de testes de toxicidade com sedimento e de análises histopatológicas em peixes. *Limnologia Fluvial: um estudo no rio Mogi-Guaçu. São Paulo: SÃO CARLOS*, 149-180.
- Miranda, A. C., dos Prazeres, K. C., Klepa, R. B., Franco, M. A. C., Silva Filho, S. C., & Santana, J. C. C. (2018). AVALIAÇÃO DO CONHECIMENTO DOS CONSUMIDORES DE DUAS CIDADES DA GRANDE SP, BRASIL, SOBRE OS IMPACTOS CAUSADOS PELO DESCARTE INCORRETO DE MEDICAMENTOS. *Interciencia*, 43(8), 580-584. Disponível em: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33957744007>
- Movasaghi, Z., Rehman, S., & ur Rehman, D. I. (2008). Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy of biological tissues. *Applied Spectroscopy Reviews*, 43(2), 134-179. <https://doi.org/10.1080/05704920701829043>
- Pereira, L. A. L., Amanajás, R. D., de Oliveira, A. M., da Silva, M. D. N. P., & Val, A. L. (2021). Health of the Amazonian fish tambaqui (*Colossoma macropomum*): Effects of prolonged photoperiod and high temperature. *Aquaculture*, 541, 736836. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736836>
- Pan, G. (2019). Roles of hepatic drug transporters in drug disposition and liver toxicity. *Drug Transporters in Drug Disposition, Effects and Toxicity*, 293-340. https://doi.org/10.1007/978-981-13-7647-4_6
- Patel, M., Taskar, K. S., & Zamek-Gliszczynski, M. J. (2016). Importance of hepatic transporters in clinical disposition of drugs and their metabolites. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 56, S23-S39. <https://doi.org/10.1002/jcph.671>
- Pereira, N. J., Santos, M. M. dos, Maião, J. P. L. da S., Campos, J. S. de P., Silva, N. D. da, Mendes, D. C. da S., Lenz, T. de M., & Santos, D. M. S. (2020). Biomarcadores histológicos em brânquias de peixes na avaliação da contaminação ambiental do Rio Mearim, Nordeste brasileiro / Histological biomarkers in fish gills in the assessment of environmental contamination of the Mearim river, Northeastern Brazil. *Brazilian Journal of Development*, 6(9), 68063-68079. <https://doi.org/10.34117/bjdv6n9-297>
- Salgado, L. D., Marques, A. E. M. L., Kramer, R. D., de Oliveira, F. G., Moretto, S. L., de Lima, B. A., ... & de Assis, H. C. S. (2019). Integrated assessment of sediment contaminant levels and biological responses in sentinel fish species *Atherinella brasiliensis* from a sub-tropical estuary in south Atlantic. *Chemosphere*, 219, 15-27. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.11.204>
- Salgado, L. D., Marques, A. E. M. L., Kramer, R. D., de Oliveira, F. G., Moretto, S. L., de Lima, B. A., ... & de Assis, H. C. S. (2021). Sediment contamination and toxic effects on Violet Goby fish (*Gobioides broussonnetii-Gobiidae*) from a marine protected area in South Atlantic. *Environmental Research*, 195, 110308. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.110308>
- Santos, M. E. S., Horký, P., Grabicová, K., Hubená, P., Slavík, O., Grabic, R., ... & Randák, T. (2021). Traces of tramadol in water impact behaviour in a native European fish. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 212, 111999. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.111999>
- Shane, B. S. (2019). Introduction to ecotoxicology. In *Basic Environmental Toxicology* (pp. 3-10). CRC Press.
- Simonato, J. D., Mela, M., Doria, H. B., Guiloski, I. C., Randi, M. A., Carvalho, P. S., ... & Martinez, C. B. (2016). Biomarkers of waterborne copper exposure in the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Aquatic toxicology*, 170, 31-41. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.11.012>
- Sousa, P. V. A. de, Sousa, M. da S., Sousa, G. da S., Souza, O. G. B. de, & Santos, T. de S. (2020). Effects of drug disposal on the environment. *Research, Society and Development*, 9(7), e198973868. <https://doi.org/10.33448/rsd-v9i7.3868>
- Szymańska, U., Wiergowski, M., Sołtyszewski, I., Kuzemko, J., Wiergowska, G., & Woźniak, M. K. (2019). Presence of antibiotics in the aquatic environment in Europe and their analytical monitoring: Recent trends and perspectives. *Microchemical Journal*, 147, 729-740. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.04.003>
- Velmurugan, B., Senthilkumaar, P., & Karthikeyan, S. (2018). Toxicity impact of fenvalerate on the gill tissue of *Oreochromis mossambicus* with respect to biochemical changes utilizing FTIR and principal component analysis. *Journal of Biological Physics*, 44(3), 301-315. <https://doi.org/10.1007/s10867-018-9484-9>
- Vieira, C. E. D., Costa, P. G., Lunardelli, B., de Oliveira, L. F., da Costa Cabrera, L., Risso, W. E., ... & dos Reis Martinez, C. B. (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. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.10.071>