



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO NORTE DO TOCANTINS
CENTRO DE CIÊNCIAS INTEGRADOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE ANIMAL E SAÚDE
PÚBLICA NOS TRÓPICOS - PPGSASPT**

MALBA GEANE ROSA MARTINS

**EFEITOS DO FÁRMACO ANTIDIABÉTICO METFORMINA SOB OS
PARÂMETROS FISIOLÓGICOS DE TAMBAQUI, *Colossoma macropomum*.**

Araguaína/TO
2024

MALBA GEANE ROSA MARTINS

**EFEITOS DO FÁRMACO ANTIDIABÉTICO METFORMINA SOB OS
PARÂMETROS FISIOLÓGICOS DE TAMBAQUI, *Colossoma macropomum***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos da Universidade Federal do Norte do Tocantins como requisito à obtenção do Título de Mestre em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Gustavo Paulino.

Araguaína- TO
2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins

R788e Rosa Martins, Malba Geane.
Efeitos do Fármaco Antidiabético Metformina Sob os Parâmetros Fisiológicos de Tabaqui, *Colossoma macropomum*. / Malba Geane Rosa Martins. – Araguaína, TO, 2024.
52 f.

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus Universitário de Araguaína - Curso de Pós-Graduação (Mestrado) em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos, 2024.

Orientador: Marcelo Gustavo Paulino

1. Cloridrato de metformina. 2. ecotoxicologia. 3. toxicidade. 4. metabólitos.
I. Título

CDD 636.089

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

MALBA GEANE ROSA MARTINS

**EFEITOS DO FÁRMACO ANTIDIABÉTICO METFORMINA SOB OS
PARÂMETROS FISIOLÓGICOS DE TAMBAQUI, *Collossoma macropomum***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos da Universidade Federal do Norte do Tocantins como requisito ao Título de Mestre em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos.

Data da aprovação: 06/03/2024

Banca Examinadora:



Prof. Dr. Marcelo Gustavo Paulino (PPGSASPT-UFNT)

Orientador



Prof. Dra. Domenica Palomaris Mariano de Souza (PPGECIM-UFNT)

Examinador externo



Prof. Dr. Sandro Estevan Moron (PPGSASPT-UFNT)

Examinador interno

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo, agradeço a Deus por me abençoar com saúde, manter minha fé e perseverança para concluir mais uma etapa importante.

Agradeço à Maria Alves, a quem devo tudo o que sou! Uma mãe maravilhosa que sempre acreditou em mim e me incentivou de todas as formas possíveis.

Ao meu orientador Prof. Dr. Marcelo pela oportunidade de pesquisar sob sua orientação, por acreditar na minha capacidade desde o início até aqui. Obrigada por cada ensinamento, confiança e incentivo. Você é um grande exemplo de pesquisador a seguir!

Ao Prof. Sandro por ceder seu laboratório para realização deste trabalho. Às técnicas e amigas Liana e Gilzele por todas as vezes que precisei de ajuda. Especialmente a Liana por não medir esforços para me ajudar a entender os protocolos e desenvolver as análises. Obrigada de coração!

Às minhas amigas Rosa Mara, Silvana e Ducilene pelo companheirismo e risadas durante a caminhada acadêmica.

À minha amiga Iasmyn, pela amizade de sempre. Você é um ser iluminado e foi crucial para tornar a caminhada mais leve e divertida!

À minha amiga e mãe do coração Mariuza, por me incentivar e não duvidar da minha capacidade de poder sempre mais.

Agradeço a Universidade Federal do Norte do Tocantins – UFNT, em especial ao Programa de Pós Graduação Em Sanidade Animal e Saúde Pública no Trópicos pela oportunidade de adquirir o Título de Mestre.

Agradeço a Banca Examinadora, à Prof^ª. Dra. Domenica Palomaris e ao Prof. Dr. Sandro Estevan pelas contribuições.

O desenvolvimento desta pesquisa contou com o auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Tocantins – FAPT/CAPES – Programa de Desenvolvimento da Pós-graduação – Parceiras Estratégicas nos Estudos, e com auxílio financeiro da PROPESQ/UFNT, edital n° 18/2023.

RESUMO

Os fármacos são contaminantes emergentes não regularmente monitorados e constantemente sendo introduzidos no ecossistema aquático e seus impactos em organismos não-alvo ainda são mal compreendidos. Como priori, a metformina (MET) é um dos hipoglicemiantes mais utilizados no tratamento de Diabetes *Mellitus* Tipo 2, cuja presença em ambientes aquáticos tem sido detectada em concentrações preocupantes em todo o mundo e causando efeitos indesejáveis a biota aquática e ao ecossistema local. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos potencialmente tóxicos da exposição aguda de MET no teleosteo amazônico *Colossoma macropomum*, com ênfase às alterações do metabolismo energético. Os peixes foram separados aleatoriamente em quatro grupos (n=10) controle e expostos a diferentes concentrações ambientais de MET ($10 \mu\text{g L}^{-1}$, $80 \mu\text{g L}^{-1}$ e $400 \mu\text{g L}^{-1}$), por 48h. Uma coleta de sangue foi realizada para análises dos parâmetros hematológicos e separação do plasma. Amostras de fígado e músculo foram coletados e congelados para análises de biomarcadores bioquímicos do metabolismo energético. Sub-amostras foram fixadas para análises histopatológicas. Após análise diferencial de leucócitos, observou-se um aumento significativo de monócitos circulantes nos grupos tratados em comparação com o grupo controle, sugerindo uma ação do sistema imunológico em resposta às concentrações de MET de forma dependente. Houve também ajustes no metabolismo energético, evidenciado pela redução de glicogênio hepático no grupo exposto a $10 \mu\text{g L}^{-1}$ para manter a glicemia plasmática e diminuição de aminoácidos livres no plasma com aumento significativo em músculo branco, foram as alterações mais pronunciadas. O aumento de concentração da MET indica uma resposta concentração-dependente, podendo inferir que descarte exacerbado desse fármaco no ambiente, possa levar a efeitos deletérios aos peixes quando submetidos às concentrações altas e longas exposições. Em exposição aguda de 48h, não se observou hepatotoxicidade quanto a análise de morfologia hepática, entretanto, há um recrutamento metabólico para desintoxicação e sobrevivência do animal.

Palavras chave: cloridrato de metformina; ecotoxicologia; toxicidade; metabólitos; hepatotóxico.

ABSTRACT

Pharmaceuticals are emerging contaminants that are not regularly monitored and are constantly being introduced into the aquatic ecosystem, and their impacts on non-target organisms are still poorly understood. As a priority, metformin (MET) is one of the most widely used hypoglycemic agents in the treatment of Type 2 Diabetes *Mellitus*, whose presence in aquatic environments has been detected at concerning concentrations worldwide, causing undesirable effects on aquatic biota and the local ecosystem. The aim of this study was to evaluate the potentially toxic effects of acute exposure to MET on the Amazonian teleost *Colossoma macropomum*, with emphasis on alterations in energy metabolism. The fish were randomly divided into four groups (n=10) control and exposed to different environmental concentrations of MET (10 $\mu\text{g L}^{-1}$, 80 $\mu\text{g L}^{-1}$, and 400 $\mu\text{g L}^{-1}$) for 48 hours. Blood samples were collected for hematological analysis and plasma separation. Liver and muscle samples were collected and frozen for biochemical biomarker analysis of energy metabolism. Subsamples were fixed for histopathological analysis. After the leukocyte differential analysis, a significant increase in circulating monocytes was observed in the treated groups compared to the control group, suggesting an immune system response to MET concentrations in a dose-dependent manner. There were also adjustments in energy metabolism, evidenced by a reduction in hepatic glycogen in the group exposed to 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ to maintain plasma glucose and a decrease in free amino acids in plasma with a significant increase in white muscle, being the most pronounced alterations. The increase in MET concentration indicates a concentration-dependent response, suggesting that the exacerbated disposal of this drug into the environment may lead to deleterious effects on fish when exposed to high concentrations and long exposures. In acute exposure of 48 hours, no hepatotoxicity was observed in the analysis of hepatic morphology; however, there is a metabolic recruitment for detoxification and animal survival.

Keywords: metformin hydrochloride; ecotoxicology; toxicity; metabolites; hepatotoxic.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPITULO I

- Figura 1: Representação esquemática das possíveis rotas dos fármacos no meio ambiente.....12
- Figura 2: Estrutura molecular da Metformina.....13
- Figura 3: Mecanismo de ação da metformina.....14
- Figura 4: Exemplar de peixe Tambaqui, *Colossoma macropomum* Cuvier, 1816.....16

CAPITULO II

- Figura 1: Valores médios (\pm E.P.M.) de glicose em músculo (A), fígado (B) plasma (C); Glicogênio muscular (D) e hepático (E); e Índice hepatossomático (IHS) (F) de *Colossoma macropomum* após 48h de exposição em diferentes concentrações ao metformina. (*) Indica diferença ($p < 0,05$) entre os grupos.....38
- Figura 2: Valores médios (\pm E.P.M.) de lactato em músculo (A), fígado (B) plasma (C); piruvato muscular (D) e hepático (E); e Índice hepatossomático (IHS) (F) de *Colossoma macropomum* após 48h de exposição em diferentes concentrações ao metformina. (*) Indica diferença ($p < 0,05$) entre os grupos.....39
- Figura 3: Índice de lesão no órgão (I_{org}) em fígado de tambaqui (*Colossoma macropomum*) em exposição aguda por 48h à metformina.....40
- Figura 4: Valores médios (\pm E.P.M.) plasmáticos de bilirrubina total (A) e bilirrubina direta (B) em *Colossoma macropomum* após 48h de exposição em diferentes concentrações ao metformina.....41

LISTA DE TABELAS

CAPITULO II

- Tabela 1- Valores médios (\pm E.P.M.) dos parâmetros hematológicos de *Colossoma macropomum* após exposição aguda de 48 horas ao hipoglicemiante metformina.....36
- Tabela 2- Valores médios (\pm E.P.M.) do metabolismo proteico de *Colossoma macropomum* após exposição aguda de 48 horas ao hipoglicemiante metformina. (*) Indica diferença ($p < 0,05$) entre o grupo controle, e (#) indica diferença entre tratados.....37
- Tabela 3- Índice de alteração individual (I_{alt}) no tecido do fígado de *Colossoma macropomum* após serem expostos à metformina por 48h em diferentes concentrações.....40

LISTA DE ABREVIACÕES

AMP	Adenosina Monofosfato
AMPK	Adenosina Monofosfato Quinase
ATP	Adenosina Trifosfato
CCA	Centro de Ciências Agrárias
CEs	Contaminantes Emergentes
CEUA	Comitê de Ética de Uso de Animais
CHCM	Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
DM2	Diabetes <i>Mellitus</i> Tipo Dois 2
EPM	Erro Padrão Da Média
ETAR	Estações de Tratamento
Hb	Concentração de Hemoglobina
HCM	Hemoglobina Corpuscular Média
Hct	Hematócrito
I _{alt}	Índice de Alterações Individual (I _{alt})
IHS	Índice Hepatosomático
I _{org}	O Índice de Lesão no Órgão
MET	Metformina
OCT1	Transportador de Cátions Orgânicos 1
RBC	“ <i>Red blood cells</i> ” – Eritrócito
Sc	Escore
UFNT	Universidade Federal do Norte do Tocantins
VCM	Volume Corpuscular Médio

SUMÁRIO

CAPITULO I: INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO.....	11
1.1 Contaminação do ecossistema aquático por fármacos.....	11
1.2 Metformina	13
1.3 Peixes como bioindicador.....	15
1.5 Biomarcadores	17
2 OBJETIVOS	20
2.1 Objetivo Geral	20
2.2 Objetivos Específicos	20

Referências

CAPITULO II: RESPOSTAS METABÓLICAS E HEMATOLÓGICAS EM *COLOSSOMA MACROPOMUM* EXPOSTO AO HIPOGLICEMIANTE METFORMINA EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES

RESUMO:	28
1 INTRODUÇÃO	29
2 MATERIAL E MÉTODO	31
2.1 Animais.....	31
2.2 Fármaco e determinação das concentrações de tratamento	31
2.3 Delineamento experimental e coleta de amostras.....	31
2.4 Análises dos parâmetros hematológicos.....	32
2.5 Análises bioquímicas	32
2.6 Análises morfológicas de fígado	34
2.7 Análise estatística	35
4 RESULTADOS	36
4.1 Parâmetros hematológicos	36
4.2 Metabolismo.....	37
4.3 Histopatologia do fígado.....	39
4.4 Análise Hepatobiliar.....	40
5 DISCUSSÃO	42
6 CONCLUSÃO.....	46

Referências

CAPITULO I: INTRODUÇÃO GERAL

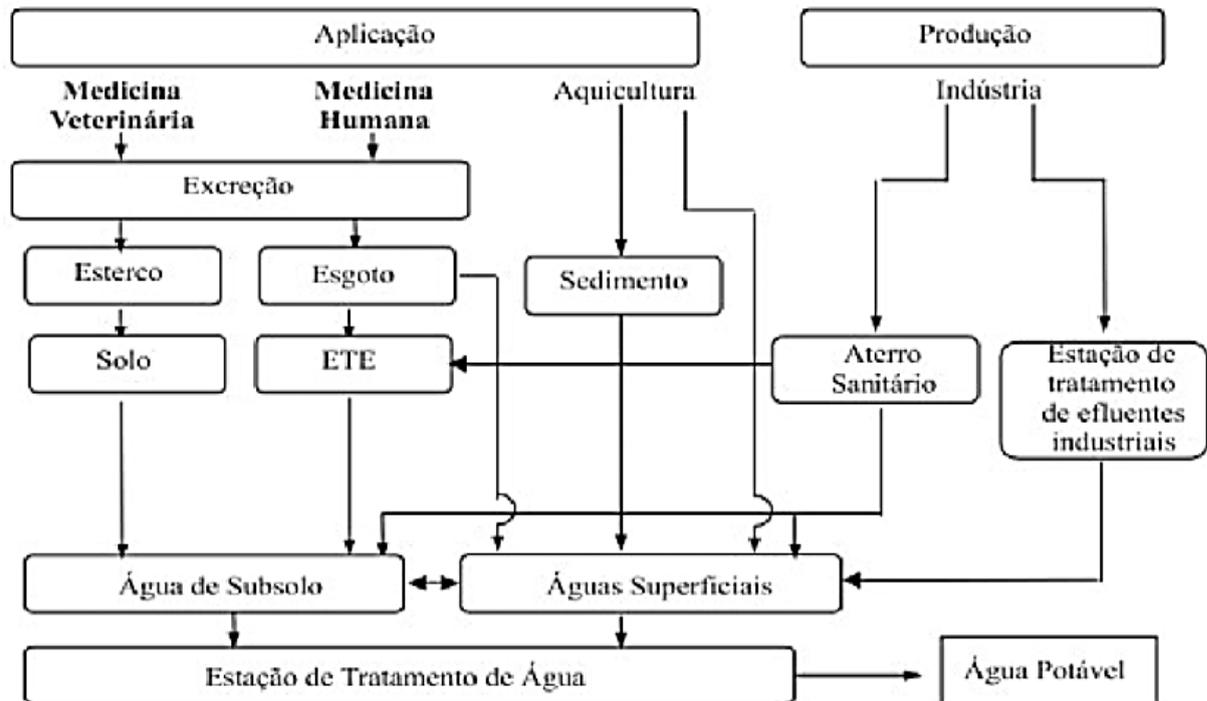
1 INTRODUÇÃO

1.1 Contaminação do ecossistema aquático por fármacos

Com o desenvolvimento das indústrias químicas, farmacêuticas e agrícolas, muitas substâncias químicas são constantemente introduzidas no meio ambiente, tornando-se um problema cada vez mais preocupante (TKACZYK; MITROWSKA; POSYNIK, 2020). Os Contaminantes Emergentes (CEs), são caracterizados como compostos químicos não regularmente monitorados e por terem efeitos indesejáveis conhecidos ou suspeitos sobre os seres humanos e ecossistemas são considerados produtos que necessitam de estudos ecotoxicológicos. Dos produtos enquadrados na categoria de CEs, destacam-se os fármacos, pois quando disponíveis na água geram inquietações em relação aos possíveis danos na fauna aquática (RODRIGUEZ-NARVAES *et al.*, 2017).

Os produtos farmacêuticos são definidos como medicamentos de prescrição, de balcão e terapêuticos veterinários, que têm por finalidade prevenir ou tratar doenças em humanos e animais, melhorando deste modo, a qualidade de vida diária (EBELE; ABDALLAH; HARRAD, 2017). Tais produtos são fabricados por seus efeitos fisiológicos específicos, sendo amplamente utilizados pela população, entretanto, muitos de seus impactos em organismos não-alvo são desconhecidos (LI *et al.*, 2019). Estas substâncias podem chegar neste meio aquático através do descarte doméstico ou como resíduos de fármacos produzidos em larga ou pequena escala (Figura 1), ocasionando efeitos de forma aguda, sobretudo, em exposição prolongada, e prejudicar a saúde humana e ambiental (PINTO *et al.*, 2016).

Figura 1: Representação esquemática das possíveis rotas dos fármacos no meio ambiente.



Fonte: Américo *et al.*, 2013, adaptado de Bila e Dezotti, 2003.

A presença de resíduos farmacológicos em recursos hídricos implica em múltiplas vias de ação, podendo interferir de modo significativo na fisiologia e, conseqüentemente, na sobrevivência de organismos não-alvos, além de causar efeitos secundários, aos quais podem alterar seu sistema imunológico, tornando-os mais susceptíveis a presença de parasitas e doenças (REIS FILHO *et al.*, 2007).

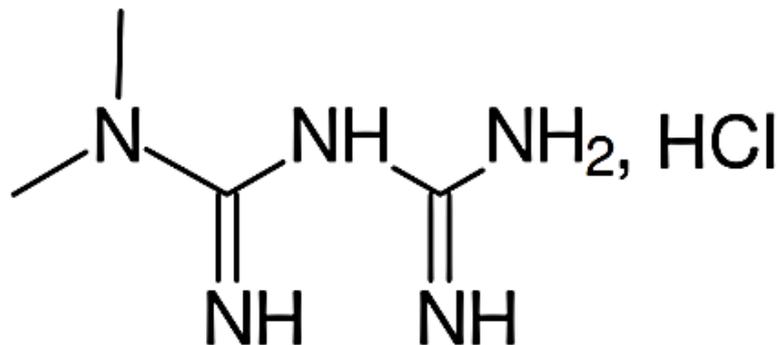
O uso de fármacos pelos seres humanos já existe há algumas décadas, porém, este consumo tem aumentado significativamente, não somente em termos numéricos, mas também quanto ao potencial das drogas utilizadas (NUNES, 2010; CHIA *et al.*, 2021). Os fármacos podem ser considerados contaminantes pseudopersistentes devido à sua contínua introdução no meio ambiente através das águas residuais, sendo, portanto, este um dos principais motivos de sua preocupação como contaminantes ambientais (GROS; PETROVIC; BARCELÓ, 2007). Devido à natureza hidrofílica e meia-vida relativamente longa a grande as estações de tratamento de águas residuais são ineficientes na remoção da maioria desses produtos (DONG *et al.*, 2013; DE OLIVEIRA *et al.*, 2020). No Brasil essa questão é ainda mais preocupante, uma vez que o saneamento básico apresenta infraestrutura precária, levando em consideração

que muitas regiões do país ainda não possuem acesso a sistemas de tratamento de esgoto (STARLING; AMORIM; LEÃO, 2019).

1.2 Metformina

A Metformina (MET) (cloridrato de 1,1-dimetilbiguanida) (Figura 2) é atualmente o hipoglicemiante oral mais utilizado para o tratamento de Diabetes *Mellitus* Tipo 2 (DM2), um distúrbio crônico em que a insulina não se liga ao quimiorreceptor localizado nos hepatócitos para sinalizar a entrada de glicose no fígado e músculo. Pertencente à família das biguanidas, este fármaco inicialmente extraído da planta *Galega officinalis*, é utilizado desde à Idade Média, e persiste até os dias atuais devido a sua notável eficácia, baixa toxicidade e de poucos efeitos adversos, além de reduzir as chances de problemas vasculares e sobrepeso durante o tratamento. Outros efeitos benéficos além do controle glicêmico são relatados para o uso da MET como câncer, síndrome do ovário policístico e obesidade devido às suas diferentes propriedades biológicas (NETO *et al.*, 2015; MANIAR *et al.*, 2017; LV; GUO, 2020; MANIQUE, FERREIRA, 2022).

Figura 2: Estrutura molecular da Metformina

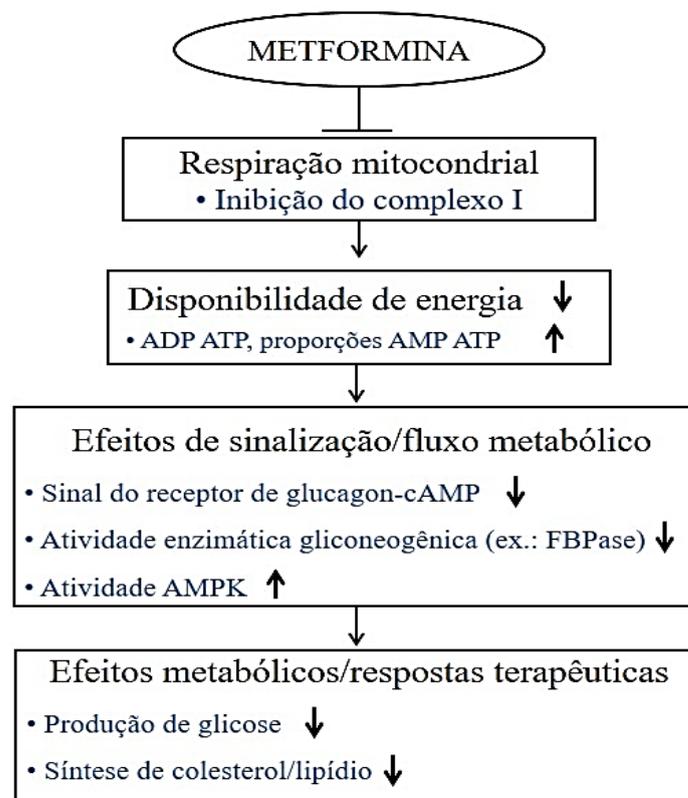


Fonte: Souza *et al.*, 2012.

Após a administração da MET, a substância localiza-se, principalmente no fígado e músculo e desencadeia uma inibição da cadeia respiratória mitocondrial dos hepatócitos, o complexo I da cadeia transportadora de elétrons. Assim, devido à queda da disponibilidade energética, a síntese de glicose através da gliconeogênese diminui para criar um equilíbrio. Dessa forma, a queda simultânea dos níveis de Adenosina Trifosfato (ATP) e o aumento da quantidade de Adenosina monofosfato (AMP) ajudam a inibir a gliconeogênese, enquanto a

alta concentração de AMP desempenha um papel inibidor chave na supressão da sinalização da proteína quinase ativada por AMP, bem como da frutose-1,6-bifosfatase (FBPase), que é uma enzima essencial necessária durante a síntese de glicose. Também irá desencadear a ativação da proteína quinase ativada por adenosina monofosfato 5' (AMPK). Assim, a produção de glicose e lipídios/colesterol é interrompida (RENA *et al.*, 2017). O mecanismo de ação da MET é melhor ilustrado na Figura 3.

Figura 3: Mecanismo de ação da metformina e as respostas intracelulares.



Fonte: adaptado de Rena *et al.*, 2017.

No Brasil ainda há poucas pesquisas sobre as concentrações de MET no ecossistema aquático. Em Juiz de Fora, pesquisadores avaliaram a presença de fármacos no Rio Paraibuna, e detectaram que os níveis de concentrações desse hipoglicemiante foram incomparavelmente mais altos que os demais contaminantes (4471 ng L⁻¹). Durante o período de análises, uma pesquisa sobre o consumo desta droga foi realizada na cidade, e concluíram que os níveis de concentrações ambientais estão intrinsecamente relacionados ao seu alto consumo (QUADRA *et al.*, 2021). Em Portugal, foram detectados níveis de concentrações de metformina entre 0,70 e 325 µg L⁻¹ em afluentes e efluentes (SANTOS *et al.*, 2013; de JESUS GAFFNEY *et al.*, 2017). A MET também foi detectada nas águas superficiais do Mar Vermelho em uma

concentração de $4,8 \mu\text{g L}^{-1}$ (ALI *et al.*, 2017). Ambrosio-Albuquerque *et al.* (2021) relataram as concentrações de MET medidas em todo o mundo, com valores que variam entre ng e μg , encontradas inclusive em água potável. O elevado consumo de MET, combinado com uma extensão insuficiente do metabolismo humano (80%), resulta em altos níveis deste fármaco em águas residuais, seguido por sua liberação no ambiente aquático devido à remoção incompleta durante o tratamento de águas residuais (SCHEURER *et al.*, 2012; TRAUTWEIN; KÜMMERER, 2011; TRAUTWEIN *et al.*, 2014; BRADLEY *et al.*, 2016).

Alguns estudos utilizando peixes como bioindicadores já relataram alguns dos efeitos tóxicos do antidiabético MET em organismos aquáticos. Niemuth *et al.* (2015) avaliaram os efeitos do fármaco em concentrações de *Pimephales promelas*, e seus resultados demonstraram que a MET induziu uma regulação positiva no gene VTG em peixes machos, indicando desregulação endócrina. Os estudos de Ussery *et al.* (2018) demonstraram que a exposição de *Oryzias latipes* a MET e 100, 32, 10, 3,2 e $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ causou alterações de vários metabólitos associados à energética celular, inclusive no peso. Expondo embriões de *Salmo trutta fario* a 5 diferentes concentrações de MET (1, 10, 100 e $1000 \mu\text{g L}^{-1}$), Jacob *et al.* (2018) observaram que o contaminante provocou aumento no glicogênio hepático das larvas expostas em maior concentração. Diante disto, é importante a realização de estudos que demostre o impacto da MET nos parâmetros bioquímicos e fisiológicos dos peixes, uma vez que os trabalhos na literatura são escassos.

1.3 Peixes como bioindicador

Os peixes podem ser encontrados em todo o ambiente aquático, desempenhando um importante papel ecológico, pois atuam como transportadores de energia de níveis tróficos inferiores para superiores (HUERTA; RODRIGUEZ-MOZAZ; BARCELO, 2012). Esses animais são frequentemente utilizados como indicadores biológicos, uma vez que apresentam sensibilidade a alterações na qualidade físico-químico da água, mudando rapidamente suas respostas biológicas quando expostos a uma determinada substância tóxica (SOUZA *et al.*, 2013; LUPI *et al.*, 2007). O uso de peixes em pesquisas ecotoxicológicas permite fazer uma correlação com um determinado fator antrópico ou natural com potencial impactante, sendo, portanto, reconhecido como indispensável na avaliação da integridade ambiental (GODEFROID; FONSECA; SILVA, 2015). Segundo Freitas e Siqueira-Souza (2009) as alterações no meio aquático podem ser refletidas nos peixes através de diferentes respostas biológicas, que variam de acordo com a plasticidade que cada espécie de peixe possui, podendo

ser refletida através dos limites da variação morfológica e fisiológica do animal frente a mudanças nas condições ambientais do meio em que vive. Nesta perspectiva, os peixes são considerados os organismos mais viáveis para o monitoramento da poluição em sistemas aquáticos (HUERTA; RODRIGUEZ-MOZAZ; BARCELO, 2012).

O tambaqui (*Colossoma macropomum*) (Figura 4) é um peixe de água doce que pertence à família Characidae, da classe Actinopterygii e ordem Characiforme. Naturalmente, é encontrado nas bacias dos rios Amazonas e Orinoco e possui uma ampla distribuição na América do Sul, assim como em diferentes países da América Central e Ásia, graças à prática da piscicultura. É o segundo maior peixe da Bacia Amazônica, ficando atrás apenas do pirarucu (*Arapaima gigas*) (GOULDING; CARVALHO, 1982), portanto é de grande importância econômica.

Figura 4: Exemplar de peixe Tambaqui, *Colossoma macropomum* Cuvier, 1816.



Fonte: Autora (2023).

A facilidade de obtenção de exemplares juvenis, manejo simplificado, potencial de crescimento considerável, capacidade de adaptação e elevada sensibilidade a compostos químicos, esta espécie tem se sobressaído como modelo animal em pesquisas para avaliação da toxicidade em ambientes aquáticos por contaminantes emergentes (CHAPADENSE *et al.*, 2009; SOARES *et al.*, 2016).

Por ser sensível e de capacidade reflexiva das condições ambientais, o sangue dos peixes tem sido frequentemente empregado como um indicador confiável de toxicidade em estudos ecotoxicológicos. Esse enfoque permite uma compreensão mais aprofundada dos efeitos

adversos dos poluentes químicos nos sistemas aquáticos (FATHY *et al.*, 2019). O fígado de peixe é um dos órgãos responsáveis por diversas funções metabólicas, incluindo o processamento de compostos orgânicos e inorgânicos, digestão e armazenamento de alimentos, bem como o metabolismo de hormônios sexuais. Por estar diretamente relacionado a processos de desintoxicação e biotransformação de xenobióticos, e por ser é um dos órgãos mais afetados por compostos químicos, o fígado é um órgão importantíssimo como bioindicador de qualidade ambiental (PARURUCKUMANI *et al.*, 2015). Além disso, o fígado é o principal órgão-alvo do mecanismo de ação da MET, uma vez que este composto age sinalizando a absorção de glicose sérica para o interior dos hepatócitos (RENA *et al.* 2017).

1.5 Biomarcadores

Através da utilização de peixes como bioindicadores, é possível realizar uma análise minuciosa do estado de saúde da espécie por meio de biomarcadores, não se restringindo unicamente à avaliação da abundância de espécies presentes no ambiente. (PAULINO, 2011). Biomarcador pode ser definido como um sinalizador de resposta biológica que o organismo obteve após sua exposição a fatores externos (SCHLENK, 1999), ou seja, é um indicativo de variação aos estressores em componentes celulares e/ou bioquímicos, modificando sua estrutura-função que são quantificáveis em amostras biológicas (MCCARTY *et al.*, 2002). Além disso, são considerados boas ferramentas ecotoxicológicas por fornecer informações relevantes no monitoramento da saúde dos peixes, bem como para avaliar a qualidade do meio ambiente e para se atentar na intervenção de possíveis efeitos adversos (LINS *et al.*, 2010).

Os biomarcadores fisiológicos são essenciais para avaliar as condições funcionais de organismos aquáticos diante da exposição a substâncias xenobióticas, proporcionando respostas cruciais sobre o impacto ambiental (VENTURA *et al.*, 2015; FATHY *et al.*, 2019). Dentre as análises dos parâmetros hematológicos está a avaliação da quantificação da concentração de hemoglobina (Hb), de eritrócitos (RBC) e hematócrito (Hct), tamanho e distribuição da hemoglobina, identificadas pelo volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM). Adicionalmente, a contagem total e diferencial de leucócitos e trombócitos é utilizado para avaliar as células presentes no tecido sanguíneo, sendo importante em estudos da qualidade ambiental por refletir o estado de saúde do sistema imunológico dos peixes ao estarem expostos a substâncias tóxicas (CLAUSS *et al.*, 2008; BARKHORDAR, *et al.*, 2013).

Por ser a primeira fonte energética, a glicose representa um importante biomarcador na avaliação dos níveis de açúcares no metabolismo do organismo em condição de estresse (KURNIAJI *et al.*, 2021). É viável avaliar o teor de glicogênio presente nos hepatócitos, comumente encontrado em animais submetidos a estresse, dado que desempenha a função de armazenar glicose como uma fonte primária energética adicional para suprir a elevada demanda nessas circunstâncias (CAMARGO *et al.*, 2007).

A variação dos valores de bilirrubina no plasma não apenas sinaliza exposição a contaminantes, mas também aponta para possíveis problemas no funcionamento hepático, reforçando a utilidade desse biomarcador na avaliação abrangente da saúde ambiental e dos organismos aquáticos (PAL *et al.*, 2015). O índice hepatossomático (IHS) é um biomarcador utilizado para avaliar a saúde do fígado em organismos, sendo particularmente útil em estudos ecotoxicológicos, pois expressa a relação entre o peso do fígado e o peso total do organismo, para dosar a reserva energética hepática, fornecendo informações importantes sobre o estado fisiológico e a resposta do organismo à exposição a xenobióticos (AL-GHAIS, 2013; IGHWELA *et al.*, 2014).

A análise dos componentes bioquímicos oferece uma representação precisa das condições metabólicas dos tecidos animais. Isso possibilita a detecção de alterações no funcionamento dos órgãos, incluindo respostas adaptativas do animal diante de desafios nutricionais e fisiológicos (SHERIDAN & MOMMSEN, 1991). Essas mudanças no âmbito bioquímico podem ser empregadas para diagnosticar doenças e representam os primeiros indícios de adaptação às mudanças ambientais, passíveis de detecção e análise (BARTON, 2002)

A histopatologia é um biomarcador que possibilita o exame de lesões em órgãos e tecidos alvos a nível microscópico. E alterações em tecidos específicos de peixes são marcadores dos efeitos da exposição à agentes estressores externos (HINTON *et al.*, 1992; YANCHEVA *et al.*, 2016). Segundo Schwaiger *et al.*, (1997), análises histopatológicas têm a capacidade de avaliar e difundir as lesões em tecidos de órgãos que são induzidas por doenças ou agentes do meio ambiente, das demais que são causadas pela exposição aos poluentes, contribuindo então para compreender a natureza da resposta ao estresse em níveis mais baixos de organização biológica. Nesse sentido, modificações histopatológicas têm sido aplicadas como biomarcadores para avaliar a saúde de peixes expostos a contaminantes, tanto em laboratório quanto em campo (CAMARGO *et al.*, 2007). Assim, mudanças na estrutura e morfologia do fígado, como por exemplo, hepatócitos com formato irregular, vacuolização

citoplasmática e núcleo descentralizado e próximo à membrana celular, são indicativos de estresse por xenobióticos (FANTA *et al.*, 2003; PARURUCKUMANI *et al.*, 2015), bem como alterações na estrutura dos ductos biliares (PAULINO, 2015).

Dessa forma, mudanças fisiológicas, bioquímicas, comportamentais ou nas estruturas dos órgãos podem servir como biomarcadores, fornecendo informações relevantes sobre a capacidade de defesa dos organismos e a habilidade de metabolizar compostos tóxicos do ambiente. Por essa razão, fazer uma análise integrada desses indicadores é fundamental para uma interpretação mais precisa dos resultados (CARDOSO, 2016).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos toxicológicos do hipoglicemiante metformina no peixe tambaqui (*Colossoma macropomum*) após exposição aguda em diferentes concentrações, via biomarcadores bioquímicos, fisiológicos e morfológicos.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar alterações nas variáveis hematológicas em *C. macropomum* após exposição aguda a metformina;
- Avaliar os efeitos do fármaco metformina no metabolismo do teleósteo *C. macropomum* após exposto por 48h.
- Avaliar efeitos da metformina no fígado via análises histopatológicas, considerando características estruturais do tecido hepático, relacionando-as com processos metabólicos.

Referências

- AL-GHAIS, S. M. Acetilcolinesterase, glutathione e índice hepatossomático como potenciais biomarcadores de poluição e depuração de esgoto em peixes. **Boletim de poluição marinha**, v. 74, n. 1, pág. 183-186, 2013.
- ALI, A. M.; RONNING, H. T.; ALARIF, W.; KALLENBORN, R.; AL-LIHAIBI, S. S. Occurrence of pharmaceuticals and personal care products in effluent-dominated Saudi Arabian coastal waters of the Red Sea. **Chemosphere**, v. 175, p. 505-513, 2017.
- AMBROSIO-ALBUQUERQUE, E. P., CUSIOLI, L. F., BERGAMASCO, R., GIGLIOLLI, A. A. S., LUPEPSA, L., PAUPITZ, B. R., PORTELA-CASTRO, A. L. B. Metformin environmental exposure: A systematic review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, p. 103588, 2021.
- AMÉRICO, J. H. P.; TORRES, N. H.; AMÉRICO, G. H. P.; DE CARVALHO, S. L. Ocorrência, destino e potenciais impactos dos fármacos no ambiente. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, v. 8, n. 2, 2013.
- BARTON, B.A. Stress in fish: A diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. **Integrative and Comparative Biology**, v. 42, p. 517-525, 2002.
- BRADLEY, P. M.; JOURNEY, C. A.; BUTTON, D. T.; CARLISLE, D. M.; CLARK, J. M.; MAHLER, B. J.; VANMETRE, P. C. Metformin and other pharmaceuticals widespread in wadeable streams of the southeastern United States. **Environmental Science & Technology Letters**, v. 3, n. 6, p. 243-249, 2016.
- CARDOSO, R. L. **Aspectos reprodutivos e biomarcadores em *Prochilodus lacustris* (Pisces, Prochilodontidae) para avaliação de impactos ambientais em uma área protegida do Maranhão e Brasil**. 2016. 99 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Aquáticos e Pesca) – Universidade Estadual do Maranhão, Programa de Pós-graduação em Recursos Aquáticos e Pesca, São Luís, 2016.
- CHAPADENSE, P. F. G.; CASTRO, F. D. J.; ALMEIDA, J. A.; MORON, S. E. Toxicity of atrazine herbicide in *Colossoma macropomum*. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 10, n. 2, p. 398-405, 2009.
- CHIA, M. A.; LORENZI, A. S.; AMEH, I.; DAUDA, S.; CORDEIRO-ARAÚJO, M. K.; AGEE, J. T.; OKPANACHI, I. Y.; ADESALU, A. T. Susceptibility of phytoplankton to the increasing presence of active pharmaceutical ingredients (APIs) in the aquatic environment: a review. **Aquatic Toxicology**, p. 105809, 2021.

- CLAUSS, T. M.; DOVE, A. DM; ARNOLD, J. E. Hematologic disorders of fish. **Veterinary clinics of North America: Exotic animal practice**, v. 11, n. 3, p. 445-462, 2008.
- DE JESUS GAFFNEY, V.; CARDOSO, V. V.; CARDOSO, E.; TEIXEIRA, A. P.; MARTINS, J.; BENOLIEL, M. J.; ALMEIDA, C. M. M. Occurrence and behaviour of pharmaceutical compounds in a Portuguese wastewater treatment plant: Removal efficiency through conventional treatment processes. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, p. 14717-14734, 2017.
- DE OLIVEIRA, M.; FRIHLING, B. E. F.; VELASQUES, J.; FILHO, F. J. C. M.; CAVALHERI, P. S.; MIGLIOLO, L. Pharmaceuticals residues and xenobiotics contaminants: Occurrence, analytical techniques and sustainable alternatives for wastewater treatment. **Science of The Total Environment**, v. 705, p. 135568, 2020.
- DONG, Z.; SENN, D. B.; MORAN, R. E.; SHINE, J. P. Prioritizing environmental risk of prescription pharmaceuticals. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 65, n. 1, p. 6067, 2013.
- EBELE, A. J.; ABDALLAH, M. A.; HARRAD, S. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in the freshwater aquatic environment. **Emerging Contaminants**, v. 3, n. 1, p. 1-16, 2017.
- FANTA, E.; RIOS, F. S.; VIANNA, A. C. C.; FREIBERGER, S. Histopathology of the fish *Corydoras paleatus* contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water and food. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 54, n. 2, p. 119-130, 2003.
- FATHY, M., MOHAMED, I. A., FARGHAL, A. I. A., TEMERAK, S. A. H., SAYED, A. E.D. H., Hemotoxic effects of some herbicides on juvenile of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. **Environ. Sci. and Pollution Research**, v. 26, p. 30857- 30865, 2019.
- FREITAS, C. E. C.; SIQUEIRA-SOUZA, F. K. O uso de peixes como bioindicador ambiental em áreas de várzea da bacia amazônica. **Revista Agrogeoambiental**, v. 1, n. 2, 2009.
- GODEFROID, R. S.; DA FONSECA, L. S.; DA SILVA, C. Utilização dos peixes do Rio Bacacheri como indicadores da qualidade ambiental. **Revista Meio Ambiente e Sustentabilidade**, v. 8, n. 4, p. 99-114, 2015.
- GOULDING, M.; CARVALHO, M. L. Life history and management of the tambaqui, (*Colossoma macroporum*, Characidae): an important Amazonian food fish. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 1, p. 107-133, 1982.

- GROS, M.; PETROVIĆ, M.; BARCELÓ, D. Wastewater treatment plants as a pathway for aquatic contamination by pharmaceuticals in the Ebro river basin northeast Guanylurea. **Chemosphere**, v. 85, n. 5, p. 765-773, 2011.
- HINTON, D. E., BAUMANN, P.C., GARDNER, G.R., HAWKINS, W.E., HENDRICKS, J.D., MURCHELANO, R.A., OKIHIRO, M.S. Histopathologic Biomarkers. In: HUGGETT R.J., KIMERLI, R.A., MEHRLE JR, P.M., BERGMAN, H. L. Biomarkers biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress. **Boca Raton: Lewis Publishers**. v. 4. 155-196, 1992.
- HUERTA, B.; RODRÍGUEZ-MOZAZ, S.; BARCELÓ, D. Pharmaceuticals in biota in the aquatic environment: analytical methods and environmental implications. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 404, n. 9, p. 2611-2624, 2012.
- IGHWELA, K. A.; AHMAD, A. B.; ABOL-MUNAFI, A. B. A seleção de índices viscerossomáticos e hepatossomáticos para a medição e análise da condição de *Oreochromis niloticus* alimentado com diferentes níveis de maltose na dieta. **Revista Internacional de Fauna e Estudos Biológicos**, v. 3, pág. 18-20, 2014.
- JACOB, S.; DÖTSCH, A.; KNOLL, S.; KÖHLER, H.; ROGALL, E.; STOLL, D.; TISLER, S.; HUHN, C.; SCHWARTZ, T.; ZWIENER, C.; TRIEBSKORN, R. Does the antidiabetic drug metformin affect embryo development and the health of brown trout (*Salmo trutta f. fario*). **Environmental Sciences Europe**, v. 30, n. 1, p. 1-16, 2018.
- KURNIAJI, A. Blood Glucose Of Tilapia Fish *Oreochromis Mossambica* As A Water Bioindicator In The Downstream Of Brantas Waters, East Java. **AAFL Bioflux**, v. 14, n. 4, 2021.
- LI, Y.; ZHANG, L.; LIU, X.; DING, G. Ranking and prioritizing pharmaceuticals in the aquatic environment of China. **Science of The Total Environment**, v. 658, p. 333-342, 2019.
- LINS, J.A.P.N; KIRSCHNIK, P.G.; QUEIROZ, U.S. Uso de peixes como biomarcadores para biomonitoramento ambiental aquático. **Revista Acad. Cienc. Agrar. Ambient**. V.8, n.4, p. 469-484, Curitiba, 2010.
- LUPI, C.; NHACARINI, N. I.; MAZON, A. F.; SÁ, O. R. Avaliação da poluição ambiental através das alterações morfológicas nas brânquias de *Oreochromis niloticus* (tilapia) nos córregos Retiro, consulta e Bebedouro, município de Bebedouro-SP. **Revista Fafibe On Line**. n.3, Bebedouro-SP, 2007.
- LV, Z.; GUO, Y. Metformin and its benefits for various diseases. **Frontiers in Endocrinology**, v. 11, p. 191, 2020.

- MANIAR, K.; MOIDEEN, A.; MITTAL, A.; PATIL, A.; CHAKRABARTI, A.; BANERJEE, D. A story of metformin-butyrate synergism to control various pathological conditions as a consequence of gut microbiome modification: Genesis of a wonder drug. **Pharmacological Research**, v. 117, p. 103-128, 2017.
- MANIQUE, M. E. S.; FERREIRA, A. M. A. P. Polycystic Ovary Syndrome in Adolescence: Challenges in Diagnosis and Management. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 44, p. 425-433, 2022.
- MCCARTY, L. S.; POWER, M.; MUNKITTRICK, K. R. Bioindicators versus biomarkers in ecological risk assessment. **Human and Ecological risk assessment**, v. 8, n. 1, p. 159-164, 2002.
- NETO, E. M. R.; MARQUES, L. A. R. V.; FERREIRA, M. A. D.; LOBO, P. L. D.; JUNIOR, F. J. G.; CAMARÃO, G. C.; DE MORAES, M. E. A. Metformina: uma revisão da literatura. **Saúde e Pesquisa**, v. 2, pág. 355-362, 2015.
- NIEMUTH, N. J.; JORDAN, R.; CRAGO, J.; BLANKSMA, C.; JOHNSON, R.; KLAPER, R. D. Metformin exposure at environmentally relevant concentrations causes potential endocrine disruption in adult male fish. **Environmental toxicology and chemistry**, v. 34, n. 2, p. 291-296, 2015.
- NUNES, B. Fármacos no ambiente: implicações ecotoxicológicas. **Revista Captar: Ciência e Ambiente para Todos**, v. 2, n. 1, p. 9-20, 2010.
- PAL, S.; RAY, S. D.; HOMECHAUDHURI, S. Evaluation of in vivo non-specific immunity and oxidative stress in *Labeo rohita* (Hamilton, 1822) infected with *Aeromonas hydrophila* as biomarker for early diagnosis. **Int J Fish Aquat Stud**, v. 3, n. 1, p. 116-124, 2015.
- PARURUCKUMANI, P. S.; RAJAN, A. M.; GANAPIRIYA, V.; KUMARASAMY, P. Bioaccumulation and ultrastructural alterations of gill and liver in Asian sea bass, *Lates calcarifer* (Bloch) in sublethal copper exposure. **Aquatic Living Resources**, v. 28, n. 1, p. 33-44, 2015.
- PARURUCKUMANI, P. S.; MAHARAJAN, A.; GANAPIRIYA, V.; NARAYANASWAMY, Y.; JEYASEKAR, R. R. Surface ultrastructural changes in the gill and liver tissue of asian sea bass *Lates calcarifer* (Bloch) exposed to copper. **Biological trace element research**, v. 168, p. 500-507, 2015.
- PAULINO, M. G.; TAVARES, D.; TEREZAN, A. P.; SACURAGUI, M. M.; PESENTI, E.; GIANI, A.; CESTARI, M. M.; FERNANDES, J. B.; FERNANDES, M. N. Biotransformations, Antioxidant System Responses, and Histopathological Indexes in the

- Liver of Fish Exposed to Cyanobacterial Extract. **Environmental toxicology and chemistry**, v. 39, n. 5, p. 1041-1051, 2020.
- PAULINO, M. G. **Efeito da exposição à atrazina nas brânquias de curimbatá, *Prochilodus lineatus* (Teleósteo, Prochilodontidae)**. 2011. 98 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Federal De São Carlos Centro De Ciências Biológicas e da Saúde, Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, São Carlos, 2011.
- PAULINO, M. G. **Efeitos do extrato bruto da cianobactéria *Radiocystis fernandoi* no teleósteo, *Hoplias malabaricus***. 2015. 141 f. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Federal De São Carlos Centro De Ciências Biológicas e da Saúde, Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, São Carlos, 2015.
- PEREIRA, C. D. S.; MARTIN-DÍAZ, M. L.; ZANETTE, J.; CESAR, A. CHOUERI, R. B.; ABESSA, D. M. S.; CATHARINO, M. G. M.; VASCONCELOS, M. B. A.; BAINY, A. C. D.; SOUSA, E. C. P. M.; VALLS, T. A. D. Integrated biomarker responses as environmental status descriptors of a coastal zone (Sao Paulo, Brazil). **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 74, n. 5, p. 1257-1264, 2011.
- PINTO, L. H.; CARDOZO, G.; SOARES, J. C.; ERZINGER, G. S. Toxicidade ambiental de efluentes advindo de diferentes laboratórios de uma farmácia magistral. **Revista Ambiente & Água**, v. 11, p. 819-832, 2016.
- QUADRA, G. R., LI, Z.; SILVA, P. S. A.; BARROS, N.; ROLAND, F.; SOBEK, A. Temporal and spatial variability of micropollutants in a Brazilian urban river. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 81, n. 1, p. 142-154, 2021.
- REIS FILHO, R. W.; BARRETO, J. C.; VIEIRA, E. M.; BEZERRA CASS, Q. Fármacos, ETES e corpos hídricos. **Ambiente & Água-An Interdisciplinary Journal of Applied Science**, v. 2, n. 3, p. 54-61, 2007.
- RENA, G.; HARDIE, D. G.; PEARSON, E. R. The mechanisms of action of metformin. **Diabetologia**, v. 60, n. 9, p. 1577-1585, 2017.
- RODRIGUEZ-NARVAEZ, O. M.; PERALTA-HERNANDEZ, J. M.; GOONETILLEKE, A.; BANDALA, E. R. Treatment technologies for emerging contaminants in water: A review. **Chemical Engineering Journal**, v. 323, p. 361-380, 2017.
- SANTOS, L. H.; GROS, M.; RODRIGUEZ-MOZAZ, S.; DELERUE-MATOS, C.; PENA, A.; BARCELÓ, D.; MONTENEGRO, M. C. B. Contribution of hospital effluents to the load of

- pharmaceuticals in urban wastewaters: identification of ecologically relevant pharmaceuticals. **Science of the Total Environment**, v. 461, p. 302-316, 2013.
- SCHEURER, M.; MICHEL, A.; BRAUCH, H. J.; RUCK, W.; SACHER, F. Occurrence and fate of the antidiabetic drug metformin and its metabolite guanylurea in the environment and during drinking water treatment. **Water research**, v. 46, n. 15, p. 4790-4802, 2012.
- SCHLENK, D. Necessity of defining biomarkers for use in ecological risk assessments. **Marine Pollution Bulletin**, v. 39, n. 1-12, p. 48-53, 1999.
- SCHWAIGER, J.; WANKE, R.; ADAM, S.; PAWERT, M.; HONNEN, W.; TRIEBSKORN, R. The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. **Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery**, Netherlands, 15 sept. 1997.
- SHERIDAN, M. A.; MOMMSEN, T. P. Effects of nutritional state on in vivo lipid and carbohydrate metabolism of coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. **General And Comparative Endocrinology**, [s.l.], v. 81, n. 3, p. 473-483, 1991.
- SOUZA, I. C.; DUARTE, I. D.; PIMENTEL, N. Q.; ROCHA, L. D.; MOROZESK, M.; BONOMO, M. M.; AZEVEDO, V. C.; PEREIRA, C. D. S.; MONFERRÁN, M. V.; MILANEZ, C. R. D.; MATSUMOTO, S. T.; WUNDERLIN, D. A.; FERNANDES, M. N. Matching metal pollution with bioavailability, bioaccumulation and biomarkers response in fish (*Centropomus parallelus*) resident in neotropical estuaries. **Environmental Pollution**. v. 180, p. 136-144, 2013.
- SOUZA, J. L. **Avaliação da secagem de metformina 850mg em leite fluidizado industrial**. 2012. 112 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Engenharia e ciências Exatas, Toledo, 2012.
- STARLING, M. C. V. M.; AMORIM, C. C.; LEÃO, M. M. D. Ocorrência, controle e destino de contaminantes de preocupação emergente em compartimentos ambientais no Brasil. **Revista de materiais perigosos**, v. 372, p. 17-36, 2019.
- TKACZYK, A.; MITROWSKA, K.; POSYNIK, A. Synthetic organic dyes as contaminants of the aquatic environment and their implications for ecosystems: A review. **Science of The Total Environment**, v. 717, p. 137222, 2020.
- TRAUTWEIN, C.; KÜMMERER, K. Incomplete aerobic degradation of the antidiabetic drug Metformin and identification of the bacterial dead-end transformation product Guanylurea. **Chemosphere**, v. 85, n. 5, p. 765-773, 2011.

- TRAUTWEIN, C.; BERSET, J. D.; WOLSCHKE, H.; KÜMMERER, K. Occurrence of the antidiabetic drug Metformin and its ultimate transformation product Guanylurea in several compartments of the aquatic cycle. **Environment international**, v. 70, p. 203-212, 2014.
- USSERY, E.; BRIDGES, K. N.; PANDELIDES, Z.; KIRWOOD, A. E.; BONETTA, D.; VENABLES, B. J.; GUCHARD, J.; HOLDWAY, D. Effects of environmentally relevant metformin exposure on Japanese medaka (*Oryzias latipes*). **Aquatic Toxicology**, v. 205, p. 58-65, 2018.
- VENTURA, A. S.; CORSINI, F. E.; GABRIEL, A. M. A. Hematologia como biomarcador de contaminação ambiental em peixes Sangue, poluentes, metais pesados. **Nutritime Revista Eletrônica**, on-line, v. 12, n. 6, p. 4500-4507, Viçosa, 2015.
- YANCHEVA, V.; VELCHEVA, I.; STOYANOVA, S.; GEORGIEVA, E. Histological biomarkers in fish as a tool in ecological risk assessment and monitoring programs: a review. **Applied ecology and environmental research**, v. 14, n. 1, p. 47-75, 2016.

CAPITULO II: RESPOSTAS METABÓLICAS E HEMATOLÓGICAS EM *COLOSSOMA MACROPOMUM* EXPOSTO AO HIPOGLICEMIANTE METFORMINA EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES.

RESUMO:

Os fármacos são contaminantes pseudopersistentes, pois, continuamente entram no meio ambiente através das águas residuais, tornando-se uma das principais preocupações como contaminantes ambientais. Este estudo investigou os efeitos do hipoglicemiante metformina no peixe *Colossoma macropomum* após exposição aguda a diferentes concentrações do fármaco. Os peixes foram divididos em quatro grupos (n=10), um controle e três a 10 $\mu\text{g L}^{-1}$, 80 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 400 $\mu\text{g L}^{-1}$ de metformina. Amostras de sangue, fígado e músculo foram utilizadas para avaliar o potencial tóxico do fármaco utilizando biomarcadores fisiológicos, bioquímicos e histopatológicos. Não foi observada mortalidade ou anormalidades comportamentais entre os grupos. Foi observado alteração nos parâmetros imunológicos indicado pelo aumento significativo de monócitos circulantes nos grupos tratados comparado ao controle, demonstrando que a ativação do sistema imunológico ocorreu de modo concentração-dependente. Houve um ajuste no metabolismo energético com a diminuição de glicogênio no grupo 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ hepático e estabilidade da glicose. O metabolismo proteico foi diretamente afetado ao diminuir aminoácidos plasmático e aumentar no músculo de todos os grupos expostos, assim como amônia é aumentada no plasma e diminuída no músculo em concentração de 400 $\mu\text{g L}^{-1}$. Foi observado diminuição de lactato em músculo na concentração de 80 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 400 $\mu\text{g L}^{-1}$, fígado de 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ e plasma de 80 $\mu\text{g L}^{-1}$, e aumento em plasma em concentração de 400 $\mu\text{g L}^{-1}$. Isso pode indicar que os peixes preferem utilizar o metabolismo proteico como fonte energética primária, e usar lactato como substrato, recrutando aminoácidos do para o músculo. As análises histopatológicas e hepatobiliares demonstraram que a Metformina não comprometeu o funcionamento do órgão quanto aos processos metabólicos e excretores de bile. O estudo sobre os efeitos da metformina em *C. macropomum* revelou que, nas concentrações testadas de modo agudo, houve alteração na fisiologia, com ajustes no fisiológicos no sangue e metabolismo, porém não influenciou na estrutura hepática e em seus processos metabólicos, portanto, não sendo hepatotóxico.

1 INTRODUÇÃO

Os ecossistemas aquáticos são naturalmente mais susceptíveis ao dano tóxico advindo de produtos químicos, uma vez que funcionam como locais de lançamentos final para a grande maioria dos resíduos humanos (NUNES, 2010). Dos xenobióticos mais encontrados neste ambiente, os fármacos vêm recebendo maior atenção nos últimos anos devido seus efeitos ecológicos não especificados, tornando-se uma questão de importância científica (GINEBRED *et al.*, 2010; BOUND; VOULVOULIS, 2005). Quando disponíveis no ambiente, os produtos químicos farmacêuticos podem interagir com os organismos vivos, causando impacto na saúde pública e meio ambiente, não somente devido à sua toxicidade aguda, bem como efeitos mutagênicos. Além disso, quando lançados nos corpos d'água, esses poluentes acumulam-se ao longo da cadeia alimentar, podendo afetar tanto a saúde humana quanto os demais organismos aquáticos (RANA *et al.*, 2017; LI *et al.*, 2019).

A Metformina (MET) é um antidiabético de via oral utilizado para o tratamento do Diabetes Mellitus Tipo II, sendo o fármaco mais prescrito mundialmente, devido a sua excelente capacidade de diminuir os níveis de glicose plasmática (LV; GUO, 2020; MARTÍN *et al.*, 2012), no entanto, ainda é pouco investigado em termos de destino ambiental e relevância para o meio aquático. Em humanos, a captação de metformina pelos hepatócitos é catalisada pelo Transportador de Cátions Orgânicos 1 (OCT1) e interfere diretamente no balanço energético por inibir o complexo I da cadeia transportadora de elétrons e, conseqüentemente, a Adenosina Monofosfato Quinase (AMPK) é ativada. Essa enzima é crucial para o controle metabólico, pois induz uma cascata de eventos intracelulares em resposta a mudança na carga elétrica da célula (GIANARELLI *et al.*, 2003; RENA *et al.*, 2017).

Devido ao consumo massivo da MET em todo o mundo, seu metabolismo incompleto pelo organismo e excreção principalmente pela urina, as estações de tratamento detectam níveis crescentes do fármaco em águas residuais e em diferentes concentrações (DE JESUS GAFFNEY *et al.*, 2017). Além disso, a maioria das Estações de Tratamento (ETAR) convencionais não elimina completamente vários produtos farmacêuticos, incluindo o MET (ZHU *et al.*, 2017), levando à presença deste composto nos efluentes das ETAR, que são descarregados no ambiente aquático (ORTIZ DE GARCÍA *et al.*, 2014). Apesar do crescente número de pesquisas que estejam empenhadas a descrever as conseqüências toxicológicas da MET, o estudo de seu mecanismo de ação em organismos não-alvo permanece inexplorado (GODOY *et al.*, 2018). Embora algumas fontes literárias ainda argumentam que esse fármaco não apresenta risco para organismos selvagens nas concentrações já relatadas (Health and

Medical Care Administration, 2021), estudos demonstraram que a MET induz efeitos adversos em organismo aquáticos dependendo dos níveis de concentrações e do organismo alvo, como por exemplo, a interferência no sistema endócrino/reprodutivo e nos organismos em crescimento (NIEMUTH e KLAPER, 2015; JACOB *et al.*, 2018; USSERY *et al.*, 2018).

Os biomarcadores fisiológicos, como a contagem de células sanguíneas e a avaliação de parâmetros hematológicos, são essenciais para entender o impacto ambiental e a exposição a substâncias xenobióticas (VENTURA *et al.*, 2015; FATHY *et al.*, 2019). A glicose é um indicador importante do metabolismo em situações de estresse, enquanto o glicogênio hepático fornece energia adicional em circunstâncias adversas (KURNIAJI *et al.*, 2021; CAMARGO *et al.*, 2007). A bilirrubina plasmática e o índice hepatossomático também são indicadores cruciais da saúde do fígado, uma vez que estão relacionados ao seu funcionamento (PAL *et al.*, 2015; AL-GHAIS, 2013; IGHWELA *et al.*, 2014), bem como a histopatologia é fundamental para examinar lesões em órgãos, revelando efeitos visíveis a níveis microscópico quanto a estrutura do tecido (HINTON *et al.*, 1992; YANCHEVA *et al.*, 2016) ajudando a distinguir lesões causadas por poluentes de outras causas, contribuindo para compreender a resposta ao estresse em níveis biológicos mais baixos (SCHWAIGER *et al.*, 1997). Os biomarcadores bioquímicos são uns dos primeiros indícios de mudanças biológicas detectáveis, muitas vezes em resposta à presença de poluentes. Além disso, eles são sensíveis a várias categorias de poluentes, demonstram alta especificidade e oferecem insights sobre os efeitos metabólicos provocados por substâncias estranhas ao organismo (VAN DER OOST *et al.*, 2003).

O uso de peixes em estudos de biomonitoramento de poluição aquática tem sido destaque devido às suas peculiaridades biológicas intimamente específicas. Além disso, podem transferir micro poluentes aos demais organismos da cadeia alimentar superior e prejudicá-los, o que implica maior interesse (ZHOU *et al.*, 2008; LINS *et al.*, 2010). Desse modo, o objetivo desta pesquisa foi avaliar os efeitos da metformina no metabolismo e parâmetros hematológicos do teleosteo *Colossoma macropomum* após exposição por 48h a diferentes concentrações.

2 MATERIAL E MÉTODO

2.1 Animais

Exemplares juvenis da espécie *Colossoma macropomum* (massa corporal = $120,9 \pm 6,1$ g e comprimento = $19 \pm 0,3$ cm) foram obtidos no setor de piscicultura do Instituto Federal do Tocantins – Campus Araguatins - TO. Posteriormente, conduzidos ao Laboratório de Morfofisiologia e Bioquímica de Peixes Neotropicais, do Centro de Ciências Agrárias (CCA) da Universidade Federal do Norte do Tocantins (UFNT), Araguaína - TO, e aclimatados por 30 dias em tanques de 3000 L, mantidos em fotoperíodo natural, constante aeração artificial, temperatura controlada de $\pm 26^{\circ}\text{C}$, pH $6,5 \pm 0,5$ e alimentação diária com ração comercial.

2.2 Fármaco e determinação das concentrações de tratamento

O fármaco Metformina (Purifarma, Índia, 99%) foi adquirido na farmácia de manipulação localizada na cidade de Araguaína -TO.

As concentrações $10 \mu\text{g L}^{-1}$ e $80 \mu\text{g L}^{-1}$ de MET foram estabelecidas de acordo com concentrações encontradas em águas superficiais e residuais, bem como já testadas em outros bioensaios (MACLAREN, *et al.*, 2018; AMBROSIO-ALBUQUERQUE *et al.*, 2021; LITTLEJOHN *et al.*, 2023; SIBIYA, *et al.*, 2023). A maior concentração utilizada de $400 \mu\text{g L}^{-1}$ foi baseado no aumento desse composto em águas residuais devido ao grande consumo (NIEMUTH *et al.*, 2015; JACÓ *et al.*, 2018; WILLIAMS, 2022).

2.3 Delineamento experimental e coleta de amostras

Exemplares juvenis de tambaqui (massa corporal = $120,9 \pm 6,1$ g e comprimento = $19 \pm 0,3$ cm) foram separados aleatoriamente em quatro grupos ($n=10$), sendo: controle, grupo livre do contaminante e expostos a $10 \mu\text{g L}^{-1}$ (M10), $80 \mu\text{g L}^{-1}$ (M80) e $400 \mu\text{g L}^{-1}$ (M400) de metformina.

A exposição ocorreu de modo agudo por 48h, em sistema estático, com monitoramento e controle das propriedades físico-químicas da água, como pH, temperatura e O_2 dissolvido, utilizando medidor Multiparâmetro (modelo HANNA, H198194). Após exposição, os peixes foram anestesiados (benzocáína $0,1 \text{ g L}^{-1}$) e, com o auxílio de seringas heparinizadas foram coletadas amostras de sangue (1 mL) para avaliação das variáveis hematológicas e

plasmáticas. Em seguida, os animais foram sacrificados via secção medular para coleta de fígado e músculo branco para análise bioquímicas e morfológicas.

O protocolo experimental foi conduzido após aprovação Comitê de Ética de Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Tocantins e certificado sob o nº 23.101.001.345/22-12.

2.4 Análises dos parâmetros hematológicos

As amostras sanguíneas foram utilizadas para determinação do hematócrito (Hct), número total de eritrócitos (RBC) e hemoglobina (Hb). A partir das variáveis hematológicas, foram estabelecidos os índices hematimétricos, Volume Corpuscular Médio (VCM), Hemoglobina Corpuscular Média (HCM) e Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM) de acordo com Sadauskas-Henrique *et al.* (2011).

Para a determinação do Hct, capilares sanguíneos foram levados a centrífuga de micro hematócrito e, posteriormente, a leitura foi determinada com auxílio de um cartão padrão específico para leitura de hematócrito. O RBC foi determinado em solução com 10 µL de sangue diluído em 2 mL de formol-citrato, e seguidamente analisado em câmara de Neubauer no microscópio de luz (aumento de 400x), cujos valores foram expressos em 10⁶ células mm³. A quantificação da concentração da hemoglobina (Hb) foi determinada com a diluição de 10 µL de sangue em 2 mL de solução de Drabkin.

Extensões sanguíneas foram confeccionadas no ato da retirada do sangue, secas em temperatura ambiente, seguidamente fixadas e coradas com um Kit Panótico Rápido e posteriormente utilizadas para contagem de leucócitos, trombócitos totais e análise diferencial de leucócitos, observados em 5.000 células sanguíneas em microscópio óptico (aumento 1000x). Para a determinação plasmática, amostras de sangue foram centrifugadas para obtenção do plasma, o qual foi utilizado para análises bioquímicas.

2.5 Análises bioquímicas

Os metabólitos dos extratos foram obtidos através da homogeneização tecidual ou da diluição em plasma em uma solução contendo 10% de ácido tricloroacético (para o extrato ácido) ou água destilada (para o extrato neutro). Em seguida, os extratos foram centrifugados por 3 minutos a 3000 rpm. O sobrenadante resultante foi utilizado para as análises subsequentes de glicose, aminoácidos livres, proteínas total, lactato, piruvato e amônia.

A quantificação de glicose foi determinada fotometricamente em extratos neutros, utilizando uma luz com comprimento de onda (λ) de 505 nm. Foi usado um kit comercial Labtest® (ref. 133) seguindo as instruções do fabricante.

A concentração de aminoácidos livres foi determinada pela reação dos aminoácidos em 2 mL de nihidrina 0,1% (em álcool isopropílico). Os extratos foram incubados por 30 min a 40°C; e centrifugados a 3000 rpm, e posteriormente lidos em espectrofotômetro de placas (Asys UVM 340) a uma λ de 570 nm, utilizando glicina como padrão (1 mM), seguindo o método de Copley (1941).

Para determinação de lactato, os homogeneizados de fígado, músculo branco e plasma, foram adicionados 20 μ L de CuSO₄ 4% e 3,5 mL de H₂SO₄, incubando a 100°C por 5 minutos. Após o resfriamento em banho de gelo, 80 μ L de p-fenilfenol foi adicionado e incubados por 1 hora. Após uma segunda incubação por 1 min e 30 seg a 100°C e resfriamento das amostras, a absorbância foi medida em $\lambda = 570$ nm, comparando com um padrão de lactato (1 mM), e acordo com o método de Harrower e Brown (1972).

A quantificação do piruvato seguiu o método descrito por Lu (1939). Extratos de fígado, músculo branco e plasma, foram adicionamos 250 μ L de dinitrofenilhidrazina 0,1% (em HCl 2 N). Após incubação por 30 minutos em banho-maria a 37°C, adicionou-se 3 mL de NaOH 1,3 N. As concentrações de piruvato foram determinadas medindo a absorbância da amostra a $\lambda = 440$ nm e comparando com um padrão de piruvato (1 mM).

A concentração de proteína total presente nos extratos foi analisado de acordo com método de Bradford, que utiliza coomassie brilliant blue G-250 (BRADFORD, 1976). Essa técnica foi adaptada para leitura em microplaca conforme detalhado por Kruger (1994), e utilizando albumina bovina (1 mg mL⁻¹) como padrão de referência. A absorbância das amostras foi registrada a $\lambda = 595$ nm.

A determinação da amônia (μ mol g tecido⁻¹) seguiu o método de Gentzkow e Masen (1942). Nos sobrenadantes dos homogeneizados de fígado, músculo branco e plasma, adicionou-se água destilada até alcançar um volume final de 2 mL, seguido pela adição de 0,5 mL de reagente de Nessler. As leituras foram feitas em espectrofotômetro de placas (Asys UVM 340) a uma $\lambda = 420$ nm e comparadas com um padrão de amônia (1 mM).

A determinação de glicogênio foi seguida de acordo com a metodologia de Bidinotto *et al.* (1997) quantificada pelo total da concentração de açúcares redutores na amostra. Para isso, 50 mg de tecido hepático foram preparados em KOH 6N e aquecidos em banho-maria a 100°C por 3 minutos. Em um tubo com 250 μ L de amostra, foi adicionado 3 mL de etanol P.A e 100

μL de sulfato de potássio (K_2SO_4) e, posteriormente centrifugado a 3.000 rpm por 3 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi diluído em água destilada. Em seguida, foram adicionados 0,5 mL de fenol e 2 mL de H_2SO_4 . A leitura foi feita em espectrofotômetro a $\lambda = 480 \text{ nm}$, utilizando um padrão de glicose (1mM).

As concentrações de bilirrubina total (BT) e bilirrubina direta (BD) foram quantificadas utilizando kit comercial Labtest® (ref. 31) e comparados com um padrão de bilirrubina (10 mg dL^{-1}) Labtest® (ref. 32). A quantificação da bilirrubina no plasma é realizada através da diazotização, levando à formação de azobilirrubina vermelha. Enquanto a bilirrubina direta (BD) é dosada em meio aquoso, a bilirrubina total (soma da direta e indireta) é medida com a ajuda de um solubilizador catalítico. As absorbâncias das amostras foram registradas utilizando um espectrofotômetro de microplacas (Asys UVM 340) a uma λ de 525 nm, e os resultados expressos em mg dL^{-1} .

2.6 Análises morfológicas de fígado

Para determinar o Índice Hepatosomático (IHS), os animais foram pesados e, posteriormente, o fígado fresco foi retirado para medir a massa. Os valores obtidos de ambos foram utilizados para calcular o IHS de acordo com a seguinte equação: $\text{IHS (\%)} = [\text{Massa órgão (g)} \times 100] / \text{Massa corpórea (g)}$ (RATTON *et al.*, 2003).

Após fixação em Bouin por 48h, sub-amostras de fígados foram desidratadas em séries crescente de etanol (70-100%) e incluídas em parafina histológica. Seguidamente, foram confeccionadas secções histológicas (5 μm) em micrótomo Leica RM 2125RT. As lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina e finalizadas com Entellan®.

As análises histopatológicas foram realizadas em microscópio de luz (magnificação de 400x), seguindo a metodologia de Paulino *et al.* (2020). Para tal, cinco campos amostrais foram selecionados aleatoriamente em 5 secções histológicas, totalizando 25 campos de amostragem analisados para cada animal. As alterações histopatológicas receberam atribuições de escore numérico (S_c), o qual representa a frequência que as patologias aparecem nos campos observados, e um fator de importância (F_i), que indica o grau de severidade da lesão, ou seja, como determinada lesão afetaria a função do órgão e a sobrevivência do animal. O escore depende da distribuição da lesão no órgão, sendo que: (1) aponta lesão inexistente; (2) lesão eventualmente presente; (3) lesão não muito frequente; (4) lesão moderadamente presente, (5) lesão muito comum. Para as representações de F_i : (1) lesão totalmente reversível, com pouca relevância patológica; (2) lesão reversível após a remoção

do agente estressor, apresentando moderada importância patológica; (3) lesões irreversíveis e com alta importância patológica. Deste modo, o índice de alteração individual do órgão (I_{alt}) é determinado multiplicando os valores de Sc e Fi ($I_{alt}=Fi \times Sc$). O índice de comprometimento morfofisiológico do órgão (I_{org}) será baseado na somatória dos valores de I_{alt} e expresso como média do grupo ($I_{org} = \Sigma I_{alt}$).

2.7 Análise estatística

Os resultados obtidos foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Foi aplicado teste de normalidade ao teste D'Agostino & Pearson. As diferenças entre o grupo controle e os grupos tratados foram identificadas por meio de análise de variância (ANOVA) One-way, seguida de pós-teste de Bonferroni ($n \geq 8$), além do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e pós-teste Dunns. Todos os testes estatísticos foram realizados utilizando o software GraphPad Prisma 5.0 e considerando diferenças de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

Durante 48h de exposição a diferentes concentrações ao fármaco metformina não foi observado mortalidade ou quaisquer anormalidades comportamentais entre os grupos tratados e o controle.

4.1 Parâmetros hematológicos

A Tabela 1 descreve os valores dos parâmetros hematológicos após exposição à MET. Não houve interferência do contaminante nas variáveis eritrocitárias, tampouco dos índices hematimétricos. Por outro lado, houve um aumento do número de monócitos entre os grupos controle e os tratados, com 73% em M10, 131% em M80 e 142% e M400, entretanto paraas demais variáveis leucocitárias não houve-diferenças significativas entre os grupos.

Tabela1 - Valores médios (\pm E.P.M.) dos parâmetros hematológicos de *Colossoma macropomum* após exposição aguda de 48 horas ao hipoglicemiante metformina.

PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS				
	C	M10	M80	M400
Variáveis eritrocitárias				
Hct (%)	24,8 \pm 1,3	21,1 \pm 1,27	22,6 \pm 1,0	21,1 \pm 1,8
RBC (10^4 células mm^3)	455,6 \pm 25,3	583,8 \pm 30,1	506,2 \pm 38,3	423,4 \pm 21,9
Hb (g dL^{-1})	19,8 \pm 1,9	20,7 \pm 1,7	19,2 \pm 1,8	17,9 \pm 1,1
Índices Hematimétricos				
VCM (μm^3)	51,2 \pm 3,7	39 \pm 3,7	47,7 \pm 4,9	40 \pm 2,6
HCM (pg célula $^{-1}$)	41,4 \pm 5,2	38 \pm 3,9	36 \pm 2,7	39 \pm 6,2
CHCM (g dL^{-1})	87,9 \pm 9,1	100 \pm 10,1	77,9 \pm 5,4	86,9 \pm 8,1
Variáveis leucocitárias				
Leucócitos totais (10^3)	7,2 \pm 0,9	11,1 \pm 2,0	7,5 \pm 0,1	7,5 \pm 1,5
Trombócitos totais (10^3)	16,4 \pm 2,0	11,1 \pm 1,1	14,4 \pm 1,5	11,6 \pm 1,3
Linfócitos (%)	81,8 \pm 3,3	78,6 \pm 3,8	77 \pm 3,3	75,4 \pm 2,7
Monócitos (%)	1,9 \pm 0,3	3,3 \pm 0,4*	4,4 \pm 0,9*	4,6 \pm 0,8*
Neutrófilos (%)	9,6 \pm 1,2	15,3 \pm 2,6	11,7 \pm 2,0	14,2 \pm 1,9
Eosinófilos (%)	0,5 \pm 0,3	0,2 \pm 0,1	0,4 \pm 0,1	0,2 \pm 0,4
Basófilos (%)	1,8 \pm 0,7	1,0 \pm 1,0	2,7 \pm 0,7	1,8 \pm 0,8
LG – PAS (%)	2,3 \pm 0,5	1,4 \pm 0,5	1,3 \pm 0,2	1,5 \pm 1,3

C = controle; M10 = metformina 10 $\mu\text{g L}^{-1}$; M80 = metformina 80 $\mu\text{g L}^{-1}$; M400 metformina 400 $\mu\text{g L}^{-1}$; (*) Indica diferença ($p < 0,05$) entre os grupos.

4.2 Metabolismo

Os valores médios do metabolismo proteico são demonstrados na Tabela 2. Em músculo branco, houve aumento na concentração de aminoácidos livres em todos os grupos expostos em relação ao controle. No plasma houve diminuição dos aminoácidos livres no grupo M400 em relação aos grupos controle e M80. Por outro lado, em fígado não houve diferenças significativas entre os grupos. Não houve alteração significativa na concentração de amônia em fígado, porém foi observada no grupo M400 diminuição da concentração em músculo e aumento na concentração plasmática em relação ao grupo controle. A concentração de proteínas totais em fígado, músculo e plasma não apresentou diferença significativa entre os grupos tratados e expostos.

Tabela 2 - Valores médios (\pm E.P.M.) do metabolismo proteico de *Colossoma macropomum* após exposição aguda de 48 horas ao hipoglicemiante metformina. (*) Indica diferença ($p < 0,05$) entre o grupo controle, e (#) indica diferença entre tratados.

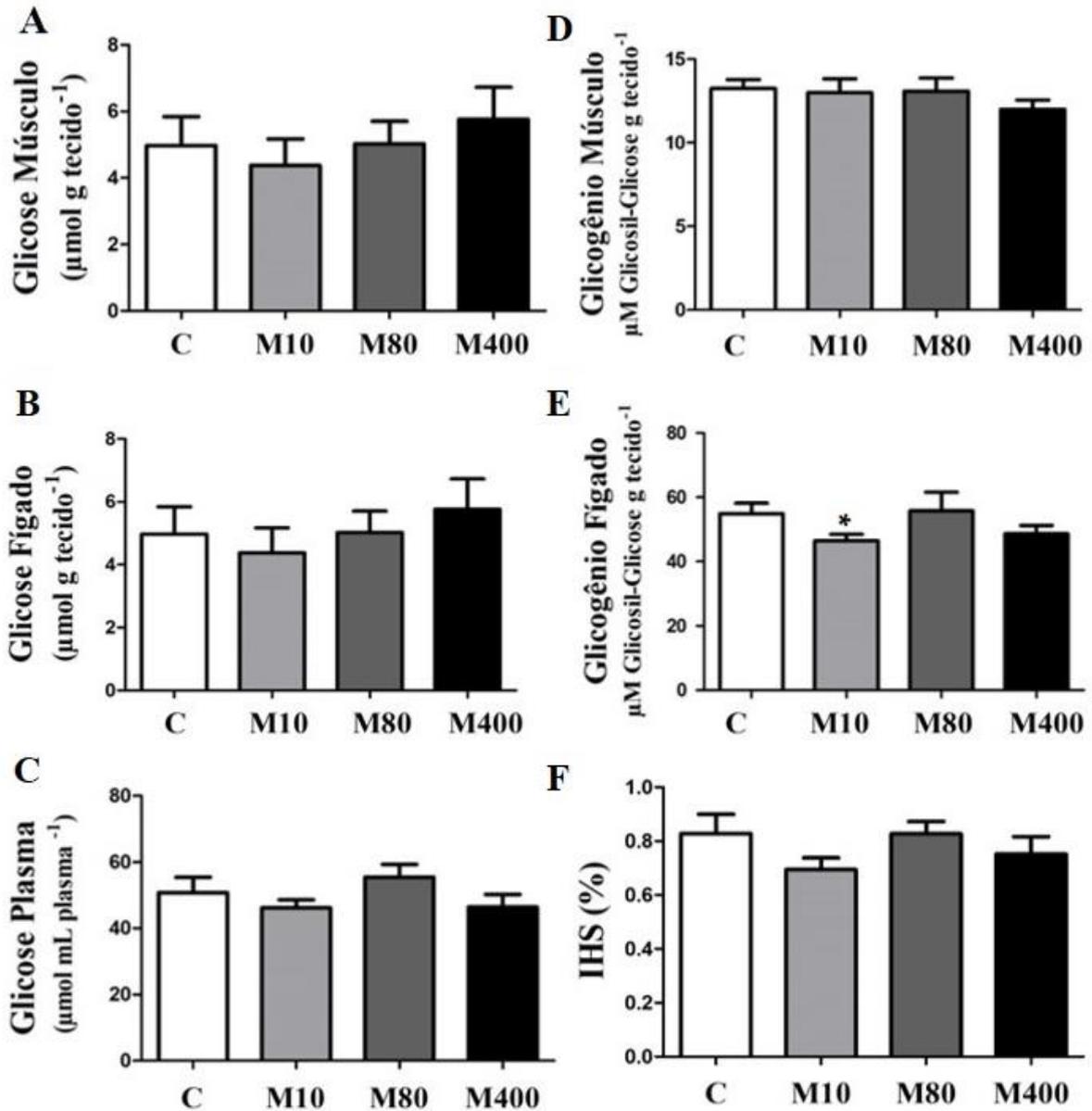
METABOLISMO PROTEICO					
		C	M10	M80	M400
Aminoácidos Livres ($\mu\text{mol g tecido}^{-1}$ ou $\mu\text{mol mL plasma}^{-1}$)	<i>Fígado</i>	80,6 \pm 5,5	84,1 \pm 5,3	84,6 \pm 3,4	76,7 \pm 4,5
	<i>Músculo</i>	15,8 \pm 0,9	30,0 \pm 6,1*	35,9 \pm 6,1*	29,6 \pm 4,8*
	<i>Plasma</i>	4,4 \pm 0,2	4,3 \pm 0,2	4,5 \pm 0,2	3,5 \pm 0,3*#
Amônia ($\mu\text{mol g tecido}^{-1}$ ou $\mu\text{mol mL plasma}^{-1}$)	<i>Fígado</i>	13,1 \pm 0,9	12,3 \pm 1,1	11,6 \pm 1,1	12,6 \pm 0,7
	<i>Músculo</i>	13,5 \pm 0,9	11,8 \pm 1,2	12,4 \pm 0,6	11,0 \pm 0,5*
	<i>Plasma</i>	5,9 \pm 0,2	6,47 \pm 0,2	6,63 \pm 0,2	7,36 \pm 0,2*
Proteínas Totais ($\mu\text{mol g tecido}^{-1}$ ou $\mu\text{mol mL plasma}^{-1}$)	<i>Fígado</i>	14,8 \pm 0,8	15,2 \pm 0,7	15,0 \pm 0,5	15,0 \pm 0,6
	<i>Músculo</i>	5,4 \pm 0,4	5,2 \pm 0,5	5,5 \pm 0,4	5,2 \pm 0,3
	<i>Plasma</i>	14,5 \pm 1,2	12,7 \pm 0,8	12,2 \pm 1,0	14,6 \pm 1,0

C = controle; M10 = metformina 10 $\mu\text{g L}^{-1}$; M80 = metformina 80 $\mu\text{g L}^{-1}$; M400 metformina 400 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Não houve alteração na glicose plasmática, muscular e hepática entre os grupos tratados quando comparados aos respectivos controles. Houve diminuição do glicogênio hepático no grupo M10 em relação ao grupo controle, não houve significância nos valores médios de glicogênio muscular entre os animais expostos e controle. As diferentes concentrações de MET

não interferiram no índice hepatossômico (IHS) dos grupos tratados em relação ao grupo controle (Figura 1).

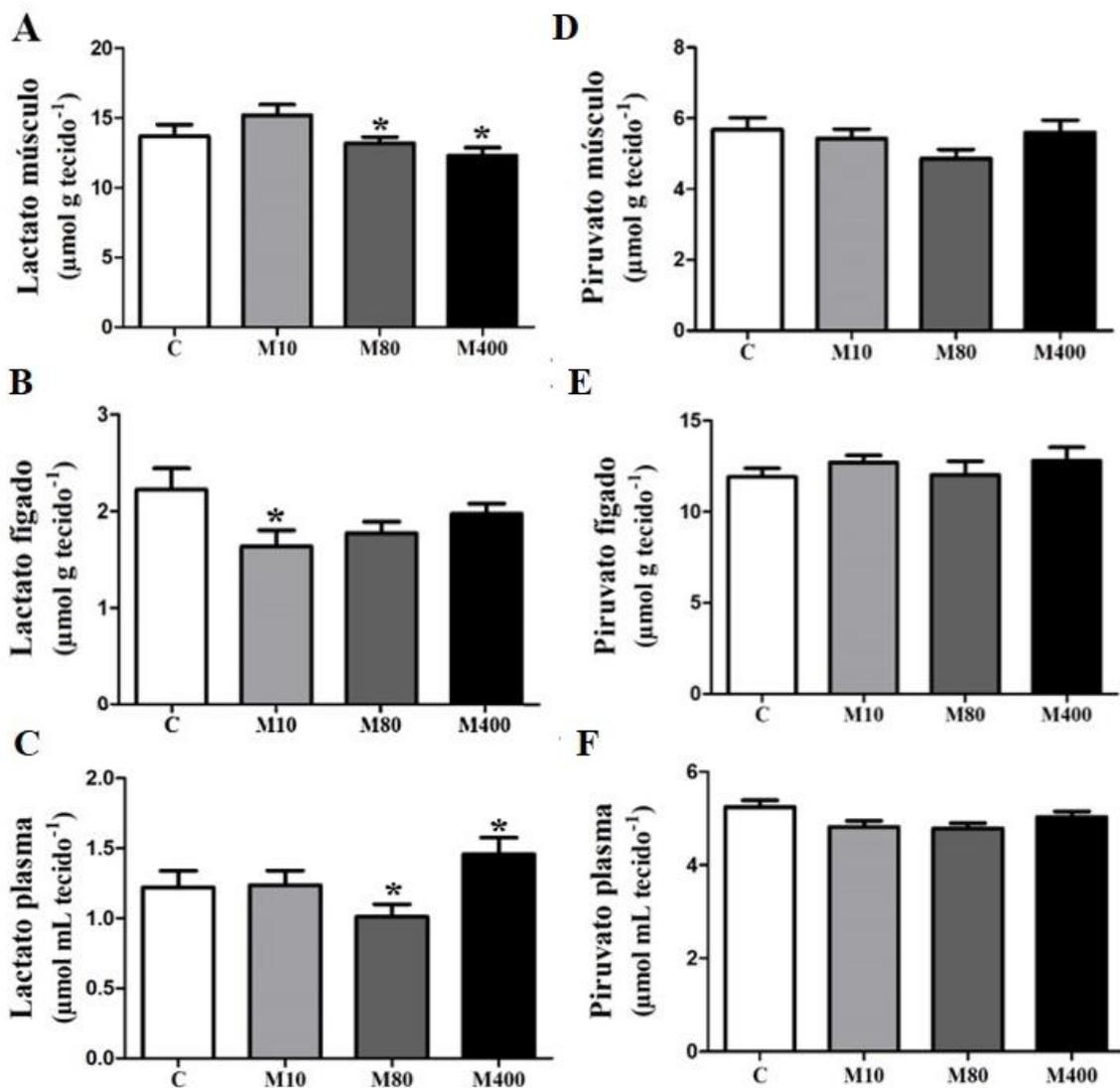
Figura 1: Valores médios (\pm E.P.M.) de glicose em músculo (A), fígado (B) plasma (C); Glicogênio muscular (D) e hepático (E); e Índice hepatossômico (IHS) (F) de *Collossoma macropomum* após 48h de exposição em diferentes concentrações ao metformina. (*) Indica diferença ($p < 0,05$) entre os grupos.



Os resultados de lactato e piruvato estão representados na Figura 2. Não houve alteração nas concentrações de piruvato em músculo (Figura 2B), fígado (Figura 2D) e plasma (Figura 2F). Em músculo, os grupos M80 e M400 apresentaram diminuição significativamente na concentração de lactato comparados ao grupo M10 (Figura 2A). Em

fígado, a concentração de lactato diminuiu significativamente no grupo M10 em relação ao controle (Figura 2C), e no plasma a concentração de lactato reduziu em M80 comparado ao grupo M400 (Figura 2E).

Figura 2: Valores médios (\pm E.P.M.) de lactato em músculo (A), fígado (B) plasma (C); piruvato muscular (D) e hepático (E); e Índice hepatossomático (IHS) (F) de *Colossoma macropomum* após 48h de exposição em diferentes concentrações ao metformina. (*) Indica diferença ($p < 0,05$) entre os grupos.



4.3 Histopatologia de fígado

O índice de alterações individual (I_{alt}) não apresentou diferenças significativas entre os grupos expostos às diferentes concentrações de MET, se comparados ao grupo controle (Tabela

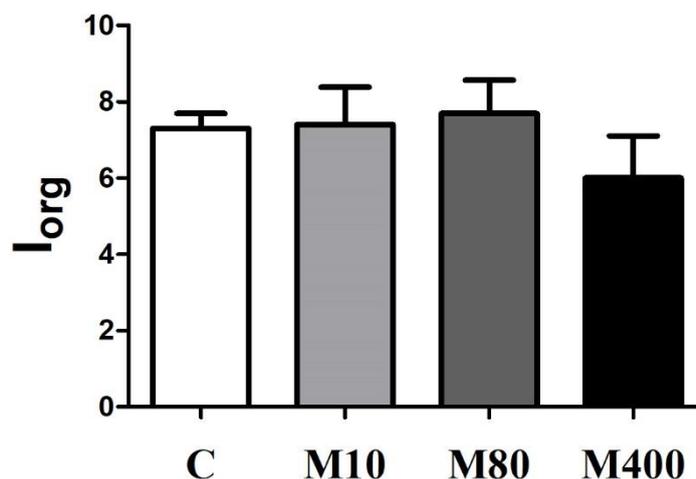
3). O índice de lesão no órgão (I_{org}) dos grupos não expressaram comprometimento quanto a função ocasionada pelas lesões (Figura 3).

Tabela 3 – Índice de alteração individual (I_{alt}) no tecido do fígado de *Colossoma macropomum* após serem expostos à metformina por 48h em diferentes concentrações.

Índice de Lesão Histopatológica Individual (I_{alt})					
Alterações em fígado	Fi	C	M10	M80	M400
Acúmulos de substâncias intracelulares	1	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1
Alterações nucleares	2	0,6 ± 0,3	0,4 ± 0,2	0,6 ± 0,3	0,2 ± 0,0
Alteração da arquitetura hepática	1	4,0 ± 0,0	3,6 ± 0,4	3,6 ± 0,4	3,6 ± 0,4
Atrofia dos hepatócitos	2	0,2 ± 0,2	0,2 ± 0,2	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Degeneração citoplasmática	1	0,7 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,5 ± 0,1
Hipertrofia dos hepatócitos	1	0,7 ± 0,1	0,8 ± 0,2	0,5 ± 0,1	0,8 ± 0,1

C = controle; M10 = metformina 10 $\mu\text{g L}^{-1}$; M80 = metformina 80 $\mu\text{g L}^{-1}$; M400 metformina 400 $\mu\text{g L}^{-1}$. Fi = Fator de importância.

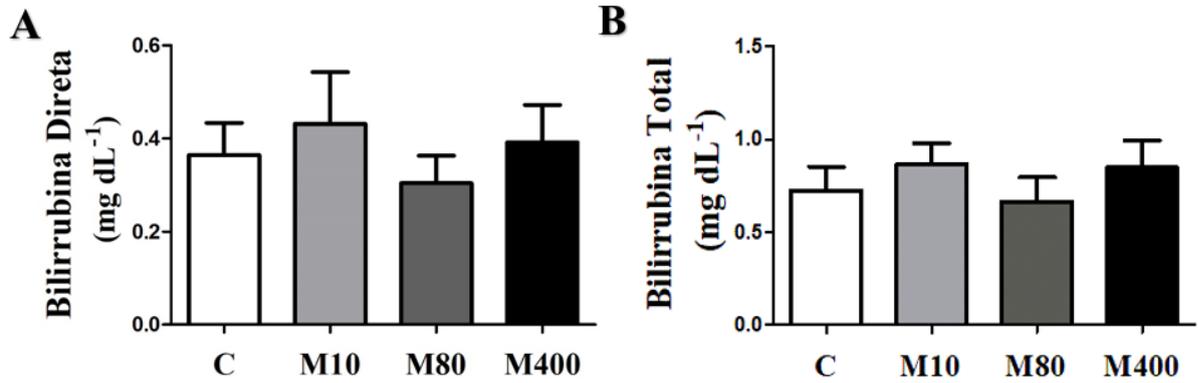
Figura 3: Índice de lesão no órgão (I_{org}) em fígado de tambaqui (*Colossoma macropomum*) em exposição aguda por 48h à metformina.



4.4 Análise Hepatobiliar

Nos parâmetros hepatobiliares, as concentrações plasmáticas de bilirrubina total e direta (Figura 4), não demonstraram diferenças significativas entre os grupos expostos à metformina e o grupo controle.

Figura 4: Valores médios (\pm E.P.M.) plasmáticos de bilirrubina total (A) e bilirrubina direta (B) em *Collossoma macropomum* após 48h de exposição em diferentes concentrações ao metformina.



5 DISCUSSÃO

Os parâmetros hematológicos fornecem informações que são fundamentais para avaliar a saúde e o estado fisiológico dos peixes, assim como as condições de alimentação e a qualidade do ambiente aquático em que habitam (FAZIO *et al.*, 2013). Neste estudo, as análises dos parâmetros hematológicos não revelaram anemia ou deficiência no transporte de gases pelos glóbulos vermelhos causado pela exposição de modo agudo a MET. Não há evidências que demonstrem mudanças nos parâmetros hematológicos para o tempo de exposição, as concentrações testadas e espécie utilizada neste estudo, diferentemente dos estudos conduzidos com a MET por BARBIERI *et al.* (2024) que observaram anormalidades nos glóbulos vermelhos de *Danio rerio* quando expostos por um longo período em concentrações de 50, 100, 150 e 10.000 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Os leucócitos desempenham um papel importantíssimo no controle da atividade imunológica de muitos animais monitorando infecções e lesões teciduais através do sangue (SARAVANAN *et al.*, 2017). O aumento de monócitos observados em todos os grupos expostos a MET, indica que o sistema imunológico foi ativado de modo dependente da concentração, considerando que estas células desempenham um papel crucial no sistema imunológico ao agir como primeira linha no sistema de defesa do organismo, principalmente durante respostas a inflamação ou infecção, aumentando sua produção e liberação na corrente sanguínea. Esses monócitos em trânsito no sangue migram para o tecido e, ao diferenciarem-se em macrófagos, ajudam a combater a infecção, fagocitando microrganismos invasores, eliminando células danificadas e participando na regulação da resposta imunológica (MITCHELL; JOHNS, 2008; D'ALOIA *et al.*, 1994). Taher *et al.* (2022) demonstraram que a MET nas concentrações de 10 mg L^{-1} e 50 mg L^{-1} induz estresse oxidativo celular e aumento de glóbulos brancos em *Clarias gariepinus*, incluindo monócitos, sugerindo que o sistema imunológico dos peixes expostos é acentuado pela superprodução das células de defesa.

A glicose desempenha um papel fundamental como fonte primária de energia para muitos organismos, incluindo peixes (ENES *et al.*, 2009). O glicogênio é uma forma de armazenamento de glicose nos organismos, funcionando como uma reserva energética adicional para suprir demandas metabólicas elevadas. (CAMARGO *et al.*, 2007). Neste estudo, observamos que a diminuição do glicogênio hepático no grupo 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ não refletiu na manutenção glicídica dos organismos. Entretanto, a depleção do glicogênio no grupo de menor concentração pode ter ocorrido para que haja o ajuste fisiológico da glicose. Algumas pesquisas

evidenciaram que os produtos farmacêuticos, podem causar a diminuição do estoque de glicogênio devido ao aumento da necessidade de energia para processos de biotransformação (SCHRAMM *et al.*, 1998; TRIEBSKORN *et al.*, 2004). Nestas circunstâncias, ocorre a liberação de hormônios como adrenalina, noradrenalina e cortisol. O cortisol ajuda na liberação de reservas de energia, estimulando processos como glicogenólise e gliconeogênese (VIJAYAN *et al.*, 1997). Peixes expostos normalmente adaptam o metabolismo para garantir a estabilidade glicêmica e o suprimento contínuo de energia (PAULINO *et al.*, 2017).

O IHS é utilizado para estimar os níveis de reserva energética no fígado de peixes expostos a xenobióticos, onde é armazenada em forma de glicogênio (AL-GHAIS, 2013; IGHWELA *et al.*, 2014), além disso, variações no IHS podem ser um indicativo de disfunção hepática (ELIZALDE *et al.*, 2023). Embora o grupo $10 \mu\text{g L}^{-1}$ tenha apresentado diminuição no glicogênio hepático, o IHS não foi proporcionalmente diminuído, o que sugere um aumento do peso do fígado por outros fatores, como por exemplo pelo armazenamento de energia pela via lipídica. Durante períodos de estresse, as demandas metabólicas podem aumentar significativamente, exigindo mais energia para manter as funções celulares essenciais e para reparar ou mitigar os danos causados pelo estresse. Juntamente com o glicogênio, os lipídios fornecem uma fonte eficiente de energia, que pode ser rapidamente mobilizada para atender a essas demandas crescentes (NAGARAJU *et al.*, 2018).

A alteração da concentração de lactato e do glicogênio pode ter ocorrido para compensar a glicose, pois pode ser fonte energética primária do organismo (BARBOSA *et al.*, 2003), o que explica o Ciclo de Cori. Nesse processo, durante a gliconeogênese, o fígado converte lactato em glicose a partir de uma série de reações enzimáticas e então é liberada na corrente sanguínea para ser utilizada pelos tecidos que necessitam de energia. Para compensar a produção de glicose sérica pelo fígado, o músculo esquelético capta a glicose e armazena em forma de glicogênio pela glicólise. O lactato produzido nesse processo é transportado novamente para o fígado e usado como substrato para converter de volta em glicose através da gliconeogênese, completando então o ciclo (DA SILVEIRA *et al.*, 2009; NELSON; COX, 2014). O piruvato é um composto intermediário importantíssimo no metabolismo de carboidratos, e também está envolvido no Ciclo de Cori, uma vez que pode ser convertido em lactato e vice-versa (NELSON; COX, 2014). Embora piruvato não tenha sido alterado, pode-se inferir que a MET interfere no balanço de reserva energética ao alterar substancialmente lactato e glicogênio.

Ao contrário de outros vertebrados, os peixes tendem a utilizar primariamente proteínas para a produção de energia. Isso significa que, em vez de dependerem principalmente de

carboidratos, os peixes têm uma preferência por metabolizar proteínas como fonte de energia em suas atividades metabólicas e de manutenção. Essa adaptação reflete as diferentes demandas metabólicas e fisiológicas associadas ao ambiente aquático em que vivem (BALLANTYNE, 2001; THIPATHI e VERMA, 2003). Embora não tenha ocorrido alteração na concentração de proteínas totais no fígado, músculo e plasma, pode-se deduzir a ocorrência de proteólise nos tecidos devido a concentração de amônia e aminoácidos livres terem sido alteradas nos grupos expostos.

Alterações nos valores de bilirrubina plasmática indicam disfunção hepática, pois o fígado é responsável por catabolizar e eliminar produtos da hemoglobina através da bile (MATSOFF; OIKARI, 1987). Para que esse sistema funcione de forma eficiente, os ductos biliares presentes no fígado precisam estar íntegros (PAULINO, 2015). Neste estudo, as análises hepato-biliares não apresentaram alterações na arquitetura ou desorganização das células dos ductos, portanto, a secreção de bilirrubina não foi afetada. Nos estudos de Elizalde *et al.* (2023) os níveis de bilirrubinas também permaneceram inalteradas quando expostas a 1, 40, 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ de MET em sistema crônico. Isso sugere que a MET não é potencialmente tóxica para o sistema estrutura-função hepato-biliar nas concentrações testadas de modo agudo.

O fígado desempenha funções cruciais no metabolismo energético, bem como atua na linha de frente nos processos de biotransformação e excreção de substâncias no organismo (HINTON *et al.*, 2008). Além disso, o metabolismo hepático exerce influência na toxicidade de xenobióticos, seja pelo acúmulo nos tecidos ou pela formação de metabólitos por meio das vias de desintoxicação de diferentes compostos (SCHULTZ & HAYTON, 1999; PAULINO, 2020). Desse modo, o tecido hepático pode apresentar alterações a nível microscópico e revelar efeitos visíveis (HINTON *et al.*, 1992; YANCHEVA *et al.*, 2016). No presente estudo, as análises histopatológicas de fígado não apresentaram lesões estatisticamente significativas que comprometessem a funcionalidade do órgão hepático do peixe tambaqui, sugerindo que para as concentrações testadas não tem ação maléfica sob o tecido. Do mesmo modo, outro estudo demonstrou que a metformina não afeta o tecido hepático em *Salmo trutta f. fario* em concentrações de 1, 10, 100 e 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ quando ainda em estágio larval (JACOB *et al.*, 2018). Mudanças na estrutura do fígado, são indicativas de estresse por xenobióticos, por estarem relacionados ao metabolismo de substâncias (FANTA *et al.*, 2003; PARURUCKUMANI *et al.*, 2015; PAULINO, 2015). Segundo Hana *et al.* (2015), a gravidade do dano depende da toxicidade e da concentração de uma substância acumulada nos tecidos, determinando o potencial de danos ao organismo afetado. Embora apresente um potencial de acúmulo no fígado

(ELIZALDE *et al.*, 2023), os poucos estudo indicam que a MET não tem efeitos deletérios sob o tecido hepático.

6 CONCLUSÃO

Ao examinar os efeitos da metformina em concentrações ambientalmente relevante em *C. macropomum*, observamos ser potencialmente tóxica ao induzir alterações fisiológicas em 48h, interferindo significativamente no ajuste do metabolismo proteico e nas reservas energéticas, assim como ativando o sistema imunológico em concentração-dependente. No entanto, a MET não apresentou ser hepatotóxica para a estrutura do fígado, ao passo que os processos metabólicos puderam ser ajustados normalmente durante o tempo de exposição. Vale ressaltar que, devido ao uso contínuo e a não remoção do fármaco em águas residuais, há uma possibilidade maior dessas substâncias serem liberadas no ambiente aquático. Esse ciclo contínuo de introdução de produtos farmacêuticos no meio ambiente pode levar à sua acumulação ao longo do tempo, aumentando sua disponibilidade e potencializando os efeitos adversos sobre a vida aquática.

Referências

- AL-GHAIS, S. M. Acetilcolinesterase, glutathione e índice hepatossomático como potenciais biomarcadores de poluição e depuração de esgoto em peixes. **Boletim de poluição marinha**, v. 74, n. 1, pág. 183-186, 2013.
- BALLANTYNE, J. S. Amino acid metabolism. **Fish physiology**, v. 20, p. 77-107, 2001.
- BARBIERI, P. A.; LUPEPSA, L.; PAUPITZ, B. R.; DE ANDRADE, C. O.; GIGLIOLLI, A. A. S.; DE BRITO PORTELA-CASTRO, A. L.; RIBEIRO, R. P.; FERNANDES, C. A.; BORIN-CARVALHO, L. A. Erythrocyte alterations in specimens of *Danio rerio* caused by exposure to metformin. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, p. 104373, 2024.
- BARBOSA, R. C. C.; GUIMARÃES, S. B.; VASCONCELOS, P. R. C.; CHAVES, C. R.; VASCONCELOS, P. R. L. Efeitos metabólicos da glutamina em ratos submetidos à queimadura por água fervente (escaldadura). **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 18, p. 537-541, 2003.
- BIDINOTTO, P. M.; MORAES, G.; SOUZA, R. H S. Hepatic glycogen and glucose in eight tropical freshwater teleost fish: a procedure for field determinations of micro samples. **Boletim técnico do CEPTA**, v. 10, n. 1, p. 53-60, 1997.
- BIDINOTTO, P. M.; MORAES, G.; SOUZA, RH de S. Hepatic glycogen and glucose in eight tropical freshwater teleost fish: a procedure for field determinations of micro samples. **Boletim técnico do CEPTA**, v. 10, n. 1, p. 53-60, 1997.
- BOUND, J. P.; VOULVOULIS, N. Household disposal of pharmaceuticals as a pathway for aquatic contamination in the United Kingdom. **Environmental health perspectives**, v. 113, n. 12, p. 1705-1711, 2005.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- COPLEY, N. G. **Alloxan and ninhydrin**. *Analytic*. v.66, p.492-493, 1941.
- DA SILVEIRA, U. S.; LOGATO, P. V. R.; DA CONCEIÇÃO PONTES, Edvânia. Utilização e metabolismo dos carboidratos em peixes. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 6, n. 1, p. 817-836, 2009.
- D'ALOIA, M. A., SAMOUR, J. H., HOWLETT, J. C., BAILEY, T. A., NALDO, J. Haemopathologic responses to chronic inflammation in the houbara bustard (*Chlamydotis undulata macqueenii*). **Comparative Haematology International**, v. 4, n. 4, p. 203-6, 1994.

- DE GARCÍA, S. O., PINTO, G. P., GARCÍA-ENCINA, P. A., & IRUSTA-MATA, R. Ecotoxicity and environmental risk assessment of pharmaceuticals and personal care products in aquatic environments and wastewater treatment plants. **Ecotoxicology**, v. 23, n. 8, p. 1517-1533, 2014.
- ELIZALDE-VELÁZQUEZ, G. A., HERRERA-VÁZQUEZ, S. E., GÓMEZ-OLIVÁN, L. M., & GARCÍA-MEDINA, S. Health impact assessment after *Danio rerio* long-term exposure to environmentally relevant concentrations of metformin and guanylurea. **Chemosphere**, v. 341, p. 140070, 2023.
- FANTA, E.; RIOS, F. S.; VIANNA, A. C. C.; FREIBERGER, S. Histopathology of the fish *Corydoras paleatus* contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water and food. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 54, n. 2, p. 119-130, 2003.
- FAZIO, F., MARAFIOTI, S., TORRE, A., SANFILIPPO, M., PANZERA, M., FAGGIO, C. Haematological and serum protein profiles of *Mugil cephalus*: effect of two different habitats. **Ichthyological research**, v. 60, p. 36-42, 2013.
- GENTZKOW, C. J.; MASEN, J. M. An accurate method for the determination of blood urea nitrogen by direct nesslerization. **Journal of Biological Chemistry**, v.143, p.531-544, 1942.
- GIANNARELLI, R., ARAGONA, M., COPPELLI, A., DEL PRATO, S.. Reducing insulin resistance with metformin: the evidence today. **Diabetes & metabolism**, v. 29, n. 4, p. 6S28-6S35, 2003.
- GINEBREDI, A.; MUÑOZ, I.; ALDA, M. L.; BRIX, R.; LÓPEZ-DOVAL, J.; BARCELÓ, D. Environmental risk assessment of pharmaceuticals in rivers: relationships between hazard indexes and aquatic macroinvertebrate diversity indexes in the Llobregat River (NE Spain). **Environment international**, v. 36, n. 2, p. 153-162, 2010.
- GODOY, A. A., DOMINGUES, I., NOGUEIRA, A. J. A., KUMMROW, F.. Ecotoxicological effects, water quality standards and risk assessment for the anti-diabetic metformin. **Environmental pollution**, v. 243, p. 534-542, 2018.
- HARROWER, J. R. G.; BROWN, C. H. Blood lactic acid. A micromethod adapted to field collection of microliter samples. **Journal of Applied Physiology**, v.32, p.224-228, 1972.
- HINTON, D. E., BAUMANN, P. C., GARDNER, G. R., HAWKINS, W. E., HENDRICKS, J. D., MURCHELANO, R. A., OKIHIRO, M. S. Histopathologic Biomarkers. In: HUGGETT R. J., KIMERLI, R. A., MEHRLE J. R, P. M., BERGMAN, H. L. Biomarkers biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress. **Boca Raton: Lewis Publishers**. v. 4. 155-196, 1992.

- HINTON, D. E.; SEGNER, H.; AU, D. W. T.; KULLMAN, S. W.; HARDMAN, R. C. Liver toxicity. In: **The toxicology of fishes**. CRC press, 2008. p. 327-400.
- IGHWELA, K. A.; AHMAD, A. B.; ABOL-MUNAFI, A. B. A seleção de índices viscerossomáticos e hepatossomáticos para a medição e análise da condição de *Oreochromis niloticus* alimentado com diferentes níveis de maltose na dieta. **Revista Internacional de Fauna e Estudos Biológicos**, v. 3, pág. 18-20, 2014.
- JACOB, S.; DÖTSCH, A.; KNOLL, S.; KÖHLER, H.; ROGALL, E.; STOLL, D.; TISLER, S.; HUHN, C.; SCHWARTZ, T.; ZWIENER, C.; TRIEBSKORN, R. Does the antidiabetic drug metformin affect embryo development and the health of brown trout (*Salmo trutta f. fario*). **Environmental Sciences Europe**, v. 30, n. 1, p. 1-16, 2018.
- KANDARI, V.; SINGH, R.; DOBHAL, R.; GUPTA, S. A review on characterization and bioremediation of pharmaceutical industries' wastewater: an Indian perspective. **Applied water science**, v. 7, n. 1, p. 1-12, 2017.
- KRUGER, N. J. The Bradford method for protein quantification. **Methods in Molecular Biology**, v. 32, p. 15-21, 1994.
- KURNIAJI, A.. Blood glucose of tilapia fish *Oreochromis mossambica* as a water bioindicator in the downstream of Brantas waters, East Java. **AAFL Bioflux**, v. 14, n. 4, 2021.
- LI, Y.; ZHANG, L.; LIU, X.; DING, G. Ranking and prioritizing pharmaceuticals in the aquatic environment of China. **Science of The Total Environment**, v. 658, p. 333-342, 2019.
- LITTLEJOHN, C.; RENAUD, J. B.; SABOURIN L.; LAPEN D. R.; PAPPAS J. J.; TUTEJA B.; HUGHES, D.; USSERY, E.; YEUNG K. K.-C.; SUMARAH, M. W. Environmental Concentrations of the Type 2 Diabetes Medication Metformin and Its Transformation Product Guanylurea in Surface Water and Sediment in Ontario and Quebec, Canada. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 42, n. 8, p. 1709-1720, 2023.
- LU, G. D. The metabolism of pyruvic acid in normal and vitamin B-deficient state. I. A rapid specific and sensitive method for the estimation of blood pyruvate. **Biochem. J.**, v.33, p.249-254, 1939.
- LV, Z.; GUO, Y. Metformin and its benefits for various diseases. **Frontiers in Endocrinology**, v. 11, p. 191, 2020.
- MARTIN, J.; BUCHBERG, W.; SANTOS, J. L.; ALONSO, E.; APARICIO, E. High-performance liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry method for the analysis of antidiabetic drugs in aqueous environmental samples. **Journal of Chromatography B**, v. 895, p. 94-101, 2012.

- MATTSOFF, L.; OIKARI, A. Acute hyperbilirubinaemia in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) caused by resin acids. **Comparative Biochemistry and physiology. C, Comparative Pharmacology and Toxicology**, v. 88, n. 2, p. 263-268, 1987.
- MITCHELL, E. B.; JOHNS, J. Avian hematology and Related Disorders. **Vet Clin Exot Anim**, v. 11, p. 501-22, 2008.
- NAGARAJU, B., HAGOS, Z., BABU, K. R., KRISHNAN, G., CHAITANYA, K., TEKA, Z., WELETNSAE, T. Effect of an insecticide chlorantraniliprole on biochemical characteristics of snakehead fish, *Channa punctatus* (Bloch, 1793). **Inn J Agri Sci**, v. 6, n. 1, p. 2321-4832, 2018.
- NELSON, D. L., COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. Artmed Editora, 2014.
- NIEMUTH, N. J.; JORDAN, R.; CRAGO, J.; BLANKSMA, C.; JOHNSON, R.; KLAPER, R. D. Metformin exposure at environmentally relevant concentrations causes potential endocrine disruption in adult male fish. **Environmental toxicology and chemistry**, v. 34, n. 2, p. 291-296, 2015.
- NIEMUTH, N. J.; KLAPER, R. D. Emerging wastewater contaminant metformin causes intersex and reduced fecundity in fish. **Chemosphere**, v. 135, p. 38-45, 2015.
- NUNES, B.. Fármacos no ambiente: implicações ecotoxicológicas. **Revista Captar: Ciência e Ambiente para Todos**, v. 2, n. 1, p. 9-20, 2010.
- PAULINO, M. G.; TAVARES, D.; TEREZAN, A. P.; SACURAGUI, M. M.; PESENTI, E.; GIANI, A.; CESTARI, M. M.; FERNANDES, J. B.; FERNANDES, M. N. Biotransformations, Antioxidant System Responses, and Histopathological Indexes in the Liver of Fish Exposed to Cyanobacterial Extract. **Environmental toxicology and chemistry**, v. 39, n. 5, p. 1041-1051, 2020.
- PAULINO, M. G; ROSSI, P. A; VENTURINI, F. P.; TAVARES, D.; DA SILVA SOUZA, N. E; SAKURAGUI, M. M, MORAES, G.; TEREZANC, A. P.; FERNANDES, J. B.; GIANI, A.; FERNANDES, M. N.. Hepatotoxicity and metabolic effects of cellular extract of cyanobacterium *Radiocystis fernandoi* containing microcystins RR and YR on neotropical fish (*Hoplias malabaricus*). **Chemosphere**, v. 175, p. 431-439, 2017.
- RANA, M. A.; JABEEN, F.; SHABBIR, S.; NAUREEN, A.; SULTANA, K.; AHMAD, I.; SHABNAM, M.. Histopathological study of liver and kidney in common carp (*Cyprinus carpio*) exposed to different doses of potassium dichromate. **Int. J. Biosci**, v. 6, n. 12, p. 108-116, 2015.

- RANA, R. S.; SINGH, P.; KANDARI, V.; SINGH, R.; DOBHAL, R.; GUPTA, S. A review on characterization and bioremediation of pharmaceutical industries' wastewater: an Indian perspective. **Applied water science**, v. 7, n. 1, p. 1-12, 2017. RANA, R. S.; SINGH, P.; RENA, G.; HARDIE, D. G.; PEARSON, E. R. The mechanisms of action of metformin. **Diabetologia**, v. 60, n. 9, p. 1577-1585, 2017.
- SARAVANAN, M.; KIM, J. Y.; HUR, K. J.; RAMESH, M.; HUR, J. R. Responses of the freshwater fish *Cyprinus carpio* to different concentrations of butachlor and oxadiazon. **Biocatal Agric Biotech.** v.11, p.275–281, 2017.
- SCHULTZ, I. R.; HAYTON, W. L. Predicting the toxicokinetics of trifluralin in rainbow trout using clearance-volume pharmacokinetic models. In: **Xenobiotics in Fish**. Boston, MA: Springer US, 1999. p. 133-148.
- SIBIYA, A., AL-GHANIM, K. A., GOVINDARAJAN, M., NICOLETTI, M., SACHIVKINA, N., VASEEHARAN, B. Biochemical Patterns and Genotoxicity of the Endocrine Disruptor Metformin in the Freshwater Fish *Labeo rohita*. **Fishes**, v. 8, n. 7, p. 380, 2023.
- TAHER, H., SABRA, M. S., SALAH EL-DIN, A. E. D., SAYED, A. E. D. H. Hemato-biochemical indices alteration, oxidative stress, and immune suppression in the African catfish (*Clarias gariepinus*) exposed to metformin. **Toxicology and Environmental Health Sciences**, v. 14, n. 4, p. 361-369, 2022.
- TRIEBSKORN, R.; CASPER, H.; HEYD, A.; EIKEMPER, R.; KÖHLER, H. R.; SCHWAIGER, J.. 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**, v. 68, n. 2, p. 151-166, 2004.
- TRIPATHI, G.; VERMA, Priyanka. Pathway-specific response to cortisol in the metabolism of catfish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 136, n. 3, p. 463-471, 2003.
- VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P.. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environ. Toxicol. Pharmacol.** 13, 57–149.
- VIJAYAN, M. M., ALURU, N., LEATHERLAND, J. F. Metabolic responses associated with confinement stress in tilapia: The role of cortisol. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 116(1), 89-95,1997.

- YANCHEVA, V.; VELCHEVA, I.; STOYANOVA, S.; GEORGIEVA, E. Histological biomarkers in fish as a tool in ecological risk assessment and monitoring programs: a review. **Applied ecology and environmental research**, v. 14, n. 1, p. 47-75, 2016.
- ZHOU, Q.; ZHANG, J.; FU, J.; SHI, J.; JIANG, G.. Biomonitoring: an appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. **Analytica chimica acta**, v. 606, n. 2, p. 135-150, 2008.
- ZHU SHUAI, Z. S.; LIU YUNGUO, L. Y.; LIU SHAOBO, L. S.; ZENG GUANGMING, Z. G.; JIANG LUHUA, J. L.; TAN XIAOFEI, T. X.; YANG CHUNPING, Y. C.. Adsorption of emerging contaminant metformin using graphene oxide. **Chemosphere**, v. 179, p. 20-28, 2017.