



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
COLEGIADO DO CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



**Ciências
Biológicas**
UEL

TRABALHO DE CONCLUSÃO DO CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ALANA MAJEWSKI TAROSSO

AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO AGUDA AO FÁRMACO PARACETAMOL EM *Danio rerio* POR MEIO DE ANÁLISES COMPORTAMENTAIS E DE DESENVOLVIMENTO EMBRIOLARVAL

Londrina – Paraná
2025

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DO CURSO DE GRADUAÇÃO
EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

ALANA MAJEWSKI TAROSSO

**AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO AGUDA AO FÁRMACO
PARACETAMOL EM *Danio rerio* POR MEIO DE
ANÁLISES COMPORTAMENTAIS E DE
DESENVOLVIMENTO EMBRIOLARVAL**

Monografia apresentada ao Curso de Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina como um dos requisitos à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Cesar Meletti

**Londrina – Paraná
2025**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

T195t TAROSSO, ALANA MAJEWSKI TAROSSO.
Avaliação da exposição aguda ao fármaco Paracetamol em Danio rerio por meio de análises comportamentais e de desenvolvimento embrionário. / ALANA MAJEWSKI TAROSSO TAROSSO. - Londrina, 2025.
36 f.

Orientador: PAULO CESAR MELETTI MELETTI.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas, 2025.
Inclui bibliografia.

1. Ecotoxicologia - TCC. 2. Danio rerio - TCC. 3. Fármacos - TCC. 4. Desenvolvimento - TCC. I. MELETTI, PAULO CESAR MELETTI. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Graduação em Ciências Biológicas. III. Título.

CDU 574

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Paulo Cesar Meletti

Profa. Dra. Claudia Bueno dos Reis Martinez

Profa. Dra. Caroline Santos

Londrina, 25 de novembro de 2025

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Universidade Estadual de Londrina, por ser casa, onde tive a oportunidade de viver tudo que sempre sonhei durante a minha graduação.

Agradeço ao Instituto Ekos Brasil, com a cooperação da UEL e FAUEL, que proporcionaram apoio financeiro durante os meus estudos.

Agradeço ao meu orientador Paulo Meletti, por toda orientação, compreensão e apoio durante a realização desse trabalho que juntos podemos concluir e ter muito orgulho.

Agradeço aos meus colegas do LEFA, que sempre me ajudaram quando precisei, durante a escrita, análises e até em desabafos.

Agradeço às minhas amigas de graduação, Mariana, Thamires, Beatriz e Mellyssa, que com certeza foram o maior presente que a UEL me deu, tornando essa jornada mais leve.

Agradeço também a todos os meus amigos, fora e dentro da UEL, que sempre acreditaram em mim e estiveram presentes comemorando minhas conquistas e ouvindo meus desabafos.

Agradeço à minha família, especialmente a minha mãe e meu pai, que sempre me apoiaram e incentivaram a estudar e alcançar meus objetivos e sonhos, e que durante esse tempo puderam me proporcionar viver tudo isso.

Por fim, agradeço ao meu namorado, Murilo, por estar presente desde o dia que passei no vestibular, até o dia da entrega do meu TCC. Por me apoiar, incentivar, me ouvir e ser o meu porto seguro sempre quando precisei, você é parte de quem eu sou e essa conquista também é sua. Obrigada por ser tudo para mim, meu grande amor.

TAROSSO, Alana Majewski. **Avaliação da exposição aguda ao fármaco Paracetamol em *Danio rerio* por meio de análises comportamentais e de desenvolvimento embriolarval.** 2025. 36 fls. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2025.

RESUMO

O paracetamol é um dos fármacos mais consumidos mundialmente e sua presença em corpos hídricos tem sido detectada em concentrações variadas, representando um risco potencial para organismos aquáticos. Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da exposição aguda (96h) a concentrações ambientalmente relevantes de paracetamol (0,5; 5,0 e 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$) em embriões e adultos de *Danio rerio*. O desenho experimental incluiu o teste de toxicidade em embriões (FET – OECD 236), análises comportamentais em larvas (144 hpf) e em adultos por meio dos testes de claro-escuro, natação espontânea e resistência natatória, além de análises biométricas de larvas e adultos. Os resultados mostraram redução significativa na frequência cardíaca em embriões expostos aos grupos experimentais, alterações no comportamento natatório larval, como redução de distância percorrida e tempo de movimento, e aumento do comprimento total e diâmetro ocular nas larvas expostas. Nos adultos, observou-se diminuição da velocidade e distância percorrida na natação espontânea nos indivíduos expostos à maior concentração, enquanto não foram encontradas alterações significativas nos testes de claro-escuro e de resistência natatória. Conclui-se que mesmo em baixas concentrações, o paracetamol é capaz de induzir alterações no desenvolvimento e comportamento de *D. rerio*, reforçando a necessidade de monitoramento contínuo desse fármaco em ambientes aquáticos, mais estudos sobre seus efeitos adversos e uma legislação ambiental para o descarte de fármacos, além de estratégias de retirada desses compostos pelo tratamento de esgoto.

Palavras-chave: Acetaminofeno. Alterações embrionárias. Comportamento de peixes. Contaminantes emergentes. Zebrafish.

TAROSSO, Alana Majewski. **Assessment of Acute Exposure to the Pharmaceutical Paracetamol in *Danio rerio* Through Behavioral and Embryolarval Development Analyses**. 2025. 36 pgs. Final Dissertation (Biological Sciences Undergraduation) – Londrina State University. Londrina. 2025.

ABSTRACT

Paracetamol is one of the most widely consumed drugs worldwide, and its presence in water bodies has been detected at varying concentrations, representing a potential risk to aquatic organisms. This study aimed to evaluate the effects of acute exposure (96h) to environmentally relevant concentrations of paracetamol (0.5, 5.0, and 50 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) on *Danio rerio* embryos and adults. The experimental design included the Fish Embryo Toxicity Test (FET – OECD 236), behavioral analyses in larvae (144 hpf) and adults through light-dark tests, spontaneous swimming, and swimming endurance tests, as well as biometric analyses of larvae and adults. The results showed a significant reduction in heart rate in embryos exposed to the experimental groups, changes in larval swimming behavior such as reduced distance traveled and movement time, and increased total length and eye diameter in exposed larvae. In adults, a decrease in speed and distance traveled during spontaneous swimming was observed in individuals exposed to the highest concentration, while no significant changes were found in the light-dark and swimming endurance tests. It is concluded that even at low concentrations, paracetamol is capable of inducing changes in the development and behavior of *D. rerio*, reinforcing the need for continuous monitoring of this drug in aquatic environments, further studies on its adverse effects, environmental legislation for drug disposal, and strategies for removing these compounds through sewage treatment.

Keywords: Acetaminophen. Emerging contaminants. Embryonic alterations. Fish behavior. Zebrafish.

LISTA DE GRÁFICOS

	Pág.
Gráfico 1 - Frequência cardíaca (bpm) analisada durante o teste FET em embriões de <i>D. rerio</i> com 96 hpf expostos ao paracetamol nas concentrações testadas.....	24
Gráfico 2 - Comportamento natatório das larvas em 144hpf: A) distância (cm); B) tempo de movimento (s); C) velocidade (cm/s).....	25
Gráfico 3 - Análises biométricas das larvas em 144hpf: A) comprimento total (mm); B) relação altura/comprimento da cabeça (mm); C) diâmetro ocular (mm).....	26
Gráfico 4 - Tempo de permanência dos peixes nos lados claro e escuro.....	28
Gráfico 5 - Teste de Resistência Natatória.....	28
Gráfico 6 - Parâmetros de Nataação Espontânea dos peixes adultos: A) velocidade geral (cm/s); B) distância total (cm); C) tempo de movimento total (s); D) tempo de ocupação nos estratos (%).....	29

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 - Placa de 24 poços e esquema de exposição dos embriões.....	18
Figura 2 - Microscópio digital (A), associado a uma plataforma de iluminação (C) para fotografia das amostras em placa de Petri (B) ou filmagens em microplacas.....	19
Figura 3 - Análise do comportamento larval de <i>Danio rerio</i> , pelo software sacam.....	19
Figura 4 - A) Medidas biométricas – comprimento total, comprimento e altura da cabeça (indivíduo normal, não exposto); B) Medidas biométricas – raio, circunferência e área ocular (indivíduo normal, não exposto)	20
Figura 5 - Desenho esquemático do teste de claro-escuro.....	21
Figura 6 - Desenho esquemático do teste de natação espontânea.....	22
Figura 7 - Desenho esquemático do teste de resistência natatória.....	23

LISTA DE TABELAS

Pág.

Tabela 1 - Parâmetros físicos e químicos da água durante o período de exposição aguda (96h) de <i>D. rerio</i> aos grupos experimentais CTR, PAR 0,5, PAR 5 e PAR 50...	17
Tabela 2 - Grupos de testes em diferentes concentrações de paracetamol.....	17
Tabela 3 - Medidas biométricas: peso (Wt), comprimento total (Lt) e comprimento padrão (Ls), e glicemia (mg/dL), em médias dos grupos experimentais CTR, PAR 0,5, PAR 5 e PAR 50, em adultos de <i>Danio rerio</i> após exposição de 96h e testes comportamentais.....	23

SUMÁRIO

Pág.

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1. Organismo teste.....	16
3.2. Aclimatação, grupos e tempos de exposição.....	16
3.3. Teste de toxicidade em embriões de peixe (FET).....	17
3.4. Comportamento no estágio larval em 144h.....	18
3.5. Biometria do estágio larval.....	19
3.6. Teste de claro-escuro.....	20
3.7. Teste de natação espontânea.....	21
3.8. Teste de resistência natatória.....	22
3.9. Biometria e determinação da glicemia.....	23
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
5. CONCLUSÕES	32
REFERÊNCIAS	33

1. INTRODUÇÃO

A água está em constante risco de contaminação por atividades antrópicas, seja por metais, agrotóxicos ou fármacos. O Brasil está em quinto lugar como maior consumidor e produtor de fármacos no mundo. Um dos fármacos mais utilizados no Brasil é o paracetamol, nome mais usado na Europa e no resto do mundo, mas é conhecido também como acetaminofeno nos Estados Unidos [bula, 2025]. O paracetamol é um analgésico e antitérmico, não opioide e não salicilato, indicado para adultos em casos de febre e para aliviar dores de cabeça, dor de garganta e dores de resfriado e gripe. Nos seres humanos, o paracetamol age como antitérmico inibindo a síntese de prostaglandina E2 no centro termorregulador do hipotálamo e é metabolizado principalmente no fígado, podendo uma pequena parte ser metabolizada pelo intestino e rins (Nogueira *et al.*, 2019).

O paracetamol, como outros fármacos, tem natureza lipofílica, o que confere maior resistência à degradação metabólica e melhor absorção. No entanto, essa característica faz com que tais fármacos sejam mais persistentes em ambientes aquáticos, não sendo removidos totalmente pelo tratamento de esgoto. Além disso, podem alcançar os corpos d'água por descarte inadequado e porque partes não são absorvidas (Nogueira *et al.*, 2019). Assim, acabam contaminando outros organismos aquáticos, como bivalves, anuros e peixes. Os efeitos do paracetamol, assim como de outros contaminantes emergentes, podem ser avaliados em organismos modelo.- Estudo revela que o paracetamol pode causar séries de eventos de hepatotoxicidade e desregulação endócrina em indivíduos de *Rhamdia quelen* (Guiloski, *et al.*, 2017). Logo, o peixe-zebra (*Danio rerio*) é um organismo modelo já estabelecido para ser usado em análises nas áreas de Ecotoxicologia, nanotecnologia, desenvolvimento e reprodução (Canedo *et al.*, 2022) devido ao ciclo reprodutivo curto, por possuir um embrião transparente, e à alta capacidade de reprodução (Pei; Strauss, 2013). Além disso, apresenta alta similaridade com a genética humana e sensibilidade a contaminantes emergentes (Chabchoubi *et al.*, 2023).

Nesta perspectiva, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos do paracetamol em *Danio rerio*, após exposição aguda de 96h. Como objetivos específicos, o trabalho visou avaliar os possíveis efeitos no desenvolvimento embriolarval pelo teste de toxicidade em embriões de peixes (FET, OECD 236) e, de

modo complementar, alterações teratogênicas no estágio larval por meio de análises biométricas. Adicionalmente, objetivou-se, ainda, verificar possíveis alterações no comportamento da espécie no estágio larval (atividade natatória) em 144 horas pós fertilização, e nos adultos pelos testes de comportamento: claro-escuro, natação espontânea e resistência natatória.

Portanto, a hipótese neste trabalho é que o paracetamol, mesmo em baixas concentrações ambientalmente relevantes, provoque alterações no desenvolvimento e comportamento de adultos e larvas de *Danio rerio* expostos aos grupos experimentais em 96 horas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Com o crescimento populacional houve aumento do uso de fármacos, logo, a indústria farmacêutica veio crescendo e desenvolvendo novos produtos. Porém, a extrema utilização destes medicamentos leva à contaminação de ambientes aquáticos, seja por descarte incorreto ou por efluentes de esgoto, sendo considerados contaminantes emergentes, atualmente objetos de muitos estudos (Perussolo *et al.*, 2023). Como um agravante neste cenário, tais contaminantes não constam na maioria das legislações ambientais relacionadas à qualidade da água (Ebele; Abdallah; Harrad, 2017).

Para analisar a qualidade de corpos d'água, é possível utilizar organismos testes, como o *Danio rerio*, uma espécie de peixe oriunda da Ásia, de pequeno porte, cujos indivíduos variam de 2 a 4 cm de comprimento. Os machos possuem listras azul-escuro e douradas, e as fêmeas, azul-escuro e prateadas. (Lars; Beata, 2022). É um organismo-teste estabelecido e amplamente utilizado em diversas análises, pelo conhecimento sobre seu comportamento, morfologia, genética e fisiologia, podendo ser utilizado em estudos ecotoxicológicos, de desenvolvimento embrionário e reprodução, seja no seu estágio adulto ou larval (Canedo *et al.*, 2022). Além disso, apresenta outras vantagens, como o baixo custo, fácil acesso, desenvolvimento embriolarval de curto período, além de possuir ovos transparentes, o que permite a visualização do desenvolvimento embrionário, característica útil para estudos em diferentes áreas do conhecimento (Canedo *et al.*, 2022).

Nesta e em outras espécies, o efeito de xenobióticos pode ser estudado por meio de biomarcadores, que são alterações que vão desde o nível molecular até o organismo. O comportamento é transversal aos níveis de organização biológica e pode ser considerado também um biomarcador (Canedo *et al.*, 2022).

Dentre os biomarcadores comportamentais, destacam-se os testes de resistência natatória ou *endurance*, em que a resistência física do animal é medida até a fadiga a diferentes níveis de correnteza (Hammer, 1995), a natação espontânea, na qual se observa a movimentação do organismo sob condições controladas, (Palstra *et al.*, 2015; Killen *et al.*, 2012) e, por fim, o teste de claro-escuro, que avalia a ansiedade, estresse e comportamento exploratório (Levin *et al.*, 2007). O teste do claro-escuro é amplamente utilizado em testes de ansiedade com o modelo zebrafish

e outros organismos, e é sensível para avaliar o efeito de fármacos que são consumidos pela população e descartados inadequadamente, e que podem contaminar aos ambientes aquáticos (Magno et al., 2015).

Além das análises de biomarcadores, há os ensaios que avaliam o desenvolvimento embrionário, como o *Fish Embryo Toxicity Test* (FET) ou Ensaio de Toxicidade com Embriões de Peixe (OECD 236).

Todas estas análises podem ser aplicadas para a avaliação de uma grande variedade de substâncias que atingem os corpos d'água e são potencialmente prejudiciais à saúde dos organismos, não só daqueles que vivem no ambiente aquático.

Atualmente, destacam-se os contaminantes emergentes, dentre eles, os fármacos. Um dos fármacos mais intensamente utilizados é o acetaminofeno (ANVISA - BRASIL, 2024), conhecido popularmente como paracetamol [bula, 2025]. Este medicamento tem efeito analgésico e antitérmico, e é utilizado para tratar sintomas de resfriado, gripe, dores de cabeça e estados febris. O Brasil é um dos países com maior consumo de fármacos no mundo e muitas vezes ocorre o uso sem controle desses medicamentos. Conforme a ANVISA (BRASIL, 2024), dentre os medicamentos mais vendidos estão os Medicamentos Isentos de Prescrição (MIP's), grupo em que se enquadra o paracetamol. Já são conhecidos diversos casos de intoxicação em seres humanos e outros organismos por paracetamol, sejam intencionais ou não, provocando intoxicação hepática, já que este é metabolizado no fígado, podendo influenciar fatores de coagulação sanguínea (Bucarechi *et al.*, 2014).

O paracetamol tem sido encontrado em diversos ambientes aquáticos (Nogueira *et al.*, 2019). A média de concentração em águas subterrâneas calculada mundialmente é de aproximadamente $0,161 \mu\text{g. L}^{-1}$, com um máximo de $230 \mu\text{g. L}^{-1}$. Na América Latina, a média é de $0,74 \mu\text{g. L}^{-1}$, com um máximo de $37 \mu\text{g. L}^{-1}$ (Aus der Beek *et al.*, 2016), embora Nascimento e colaboradores (2023) tenham encontrado em águas superficiais e subterrâneas no Brasil, concentrações de até $533,64 \mu\text{g. L}^{-1}$, nas regiões de Orocó, Santa Maria da Boa Vista e Petrolândia. As altas concentrações ambientais de fármacos tornaram-se mais evidentes durante e após a pandemia da COVID-19, devido ao aumento do consumo de medicamentos, como paracetamol, ibuprofeno e dipirona.

O paracetamol é um fármaco que pode influenciar e provocar diversas reações, tanto em invertebrados quanto em vertebrados, como estresse oxidativo no crustáceo *Daphnia magna* (Liu; Ding; Nie, 2019), neurotoxicidade no poliqueta *Hediste diversicolor* (Barbosa *et al.*, 2020), alterações no sistema antioxidante e nas gônadas dos machos do bagre *Rhamdia quelen* (Perussolo *et al.*, 2023) e malformações durante o desenvolvimento embrionário no peixe *Cyprinus carpio* (Gutiérrez-Noya *et al.*, 2021).

Já existem diversos estudos com o peixe da espécie *Danio rerio*, exposto a concentrações ambientalmente relevantes de paracetamol. De acordo com Elizalde-Velázquez e colaboradores (2022), o paracetamol combinado ao ciprofloxacino, um antibiótico, induziu indivíduos de *D. rerio* ao estresse oxidativo, genotoxicidade, regulação positiva de genes relacionados à apoptose e alterações histológicas no fígado. Rosas-Ramírez (2022) encontrou alterações teratogênicas na mesma espécie nesta combinação de fármacos. Além disso, o paracetamol causa alterações de maneira dose-dependente na taxa reprodutiva, alterando o funcionamento da gametogênese e sua fertilidade em *D. rerio* (Moreira *et al.*, 2023), também no desenvolvimento de embriões, causando diversas mal formações e até impedindo o seu desenvolvimento embriolarval (David e Pancharatna, 2009). São também encontradas alterações no próprio estágio larval, como efeitos bioquímicos e epigenéticos e alterações no comportamento locomotor (Nogueira *et al.*, 2019).

Logo, é necessário a realização de estudos dos efeitos adversos destes fármacos nos organismos para que possa ser conhecido os seus mecanismos de ação e como estes podem prejudicar os animais que residem nestes ambientes. Além disso, prever soluções para seu descarte inadequado e estratégias de retirada desse contaminantes dos efluentes aquáticos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ORGANISMO TESTE

No projeto foi utilizado como organismo modelo o peixe da espécie *Danio rerio*, conhecido popularmente como paulistinha, peixe-zebra ou *zebrafish*. *D. rerio* é uma espécie de água doce, originária do continente Asiático (Faria, 2022). É amplamente estabelecido como organismo modelo em estudos de ecotoxicologia, comportamento, desenvolvimento e reprodução, devido ao fácil acesso e de baixo custo, também por suas características morfológicas, comportamentais e fisiológicas, sendo um modelo versátil para estudo de contaminantes e poluentes emergentes, tendo em vista alguns trabalhos testados com fármacos (Kachanov *et al*, 2023).

3.2 ACLIMATAÇÃO, GRUPOS E TEMPOS DE EXPOSIÇÃO

Antes de iniciar os testes com os animais (n total=60) nas devidas concentrações do fármaco, estes passaram por um período de aclimatação de no mínimo 10 dias, divididos em dois aquários de vidro de 30L, contendo água desclorada, no Laboratório de Ecofisiologia Animal (LEFA)/UEL/CCB e por um período mínimo de 10 dias em temperatura controlada de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotoperíodo 14:10 (claro/escuro). Os mesmos animais que serviram como matrizes reprodutivas, foram posteriormente utilizados nos testes comportamentais.

Tanto na aclimatação, quanto na exposição, a qualidade da água foi monitorada diariamente quanto a temperatura ($^\circ\text{C}$), pH, condutividade e concentração de oxigênio dissolvido (OD). Os valores médios dos parâmetros monitorados durante os testes podem ser observados na Tabela 1. Durante a aclimatação os aquários foram sifonados duas vezes por semana, com renovação parcial da água, conforme os níveis de excretas. Os animais foram alimentados diariamente com ração em flocos para peixes ornamentais (Alcon Basic[®]) e artêmias congeladas, e houve monitoramento de amônia não ionizada e de nitrito, que estiveram abaixo dos valores determinados com os kits analíticos (Labcon[®]) - (abaixo de $0,015 \text{ mg NH}_3 \cdot \text{L}^{-1}$ e de $1,75 \text{ mg NO}_2^- \cdot \text{L}^{-1}$) na faixa de pH e temperatura dos testes.

Para as exposições, tanto de embriões quanto de adultos, foram determinadas as concentrações de paracetamol (Sigma-Aldrich) de $0 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (controle negativo), $0,5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, $5,0 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, $50 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, preparada primeiramente uma solução mãe, depois colocadas com ajuda de pipetas e provetas, as quais estão dentro de faixas ambientalmente relevantes (Aus der Beek *et al.*, 2016; Nogueira *et al.*, 2019;

Nascimento et al., 2023). Os grupos foram nominados, conforme as concentrações acima, de CTR, PAR 0,5, PAR 5 e PAR 50, demonstrados na Tabela 2.

Tabela 1 – Parâmetros físicos e químicos da água durante o período de exposição aguda (96h) de *D. rerio* aos grupos experimentais CTR, PAR 0,5, PAR 5 e PAR 50.

Grupo	Temperatura (C°)	pH	Condutividade (mS cm ⁻¹)	Oxigênio dissolvido (mg L ⁻¹)
CTR	26,10 ± 0,23	7,50 ± 0,68	0,80 ± 0,08	6,67 ± 0,23
PAR 0,5	25,95 ± 0,23	7,47 ± 0,52	0,82 ± 0,05	6,60 ± 0,18
PAR 5	25,75 ± 0,17	7,77 ± 0,12	0,80 ± 0,01	6,65 ± 0,12
PAR 50	25,75 ± 0,17	7,72 ± 0,09	0,75 ± 0,01	5,40 ± 0,51

Fonte: a própria autora.

Tabela 2: Grupos de testes em diferentes concentrações de paracetamol.

Grupos	Concentrações	Exposição
Controle (n=15)	0 µg. L ⁻¹	96h
PAR 0,5 (n=15)	0,5 µg. L ⁻¹	96h
PAR 5 (n=15)	5,0 µg. L ⁻¹	96h
PAR 50 (n=15)	50 µg. L ⁻¹	96h

Fonte: a própria autora.

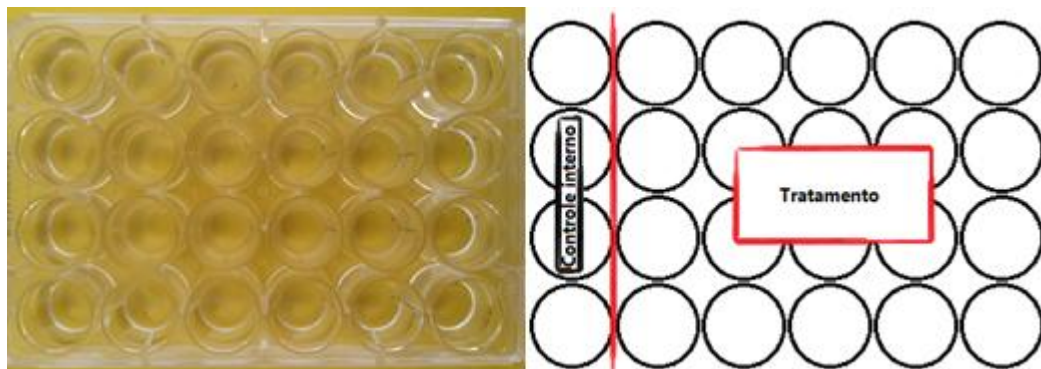
3.3 TESTE DE TOXICIDADE DE EMBRIÕES DE PEIXES (FET)

O teste FET (Teste de toxicidade em embriões de peixes) foi feito em aquários de 20L, compostos por 7 fêmeas e 8 machos, em que a reprodução dos parentais foi realizada em grupo, onde são instaladas armadilhas para a coleta dos ovos fertilizados, evitando a predação destes pelas próprias matrizes. Os ovos são colocados em placas de Petri com as respectivas concentrações de teste/controle para exposição prévia durante o período de seleção dos ovos fertilizados; logo após é feita a seleção de embriões viáveis e determinação da taxa de fertilização por meio do microscópio invertido. Posteriormente à seleção, os embriões inviáveis são descartados e os embriões fertilizados viáveis são colocados em placas de 24 poços,

com um ovo em cada poço, com as devidas concentrações em cada placa: controle ($0 \mu\text{g.L}^{-1}$), $0,5\mu\text{g.L}^{-1}$, $5,0\mu\text{g.L}^{-1}$, $50\mu\text{g.L}^{-1}$ e uma placa de controle positivo (composto por 3,4-Dicloroanilina (3,4-DCA, 4mg/L) – tendo todas as placas um controle negativo interno composto por água reconstituída, conforme demonstrado na Figura 1. Todos os embriões foram analisados diariamente quanto ao seu desenvolvimento embriolarval durante até 96 horas.

Os parâmetros padrão analisados do FET foram, de acordo com a norma OECD 236 (2013): coagulação/mortalidade, ausência/presença de somitos, desprendimento da cauda e ausência/presença de batimentos cardíacos. Além destes, foram considerados parâmetros adicionais, como: determinação da frequência cardíaca, observação de edemas pericárdicos e/ou vitelínicos, hemocoagulação, tortuosidade do corpo, falta de pigmentação e outras alterações morfológicas que chamassem a atenção.

Figura 1 – Placa de 24 poços e esquema de exposição dos embriões

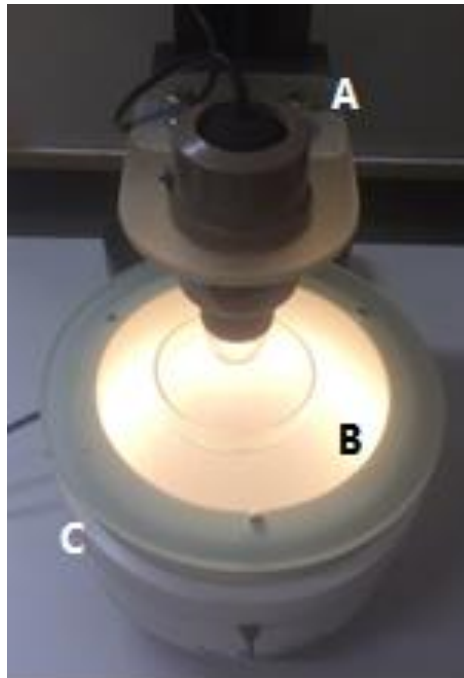


Fonte: (Cuenca *et al.*, 2021).

3.4 COMPORTAMENTO NO ESTÁGIO LARVAL EM 144h

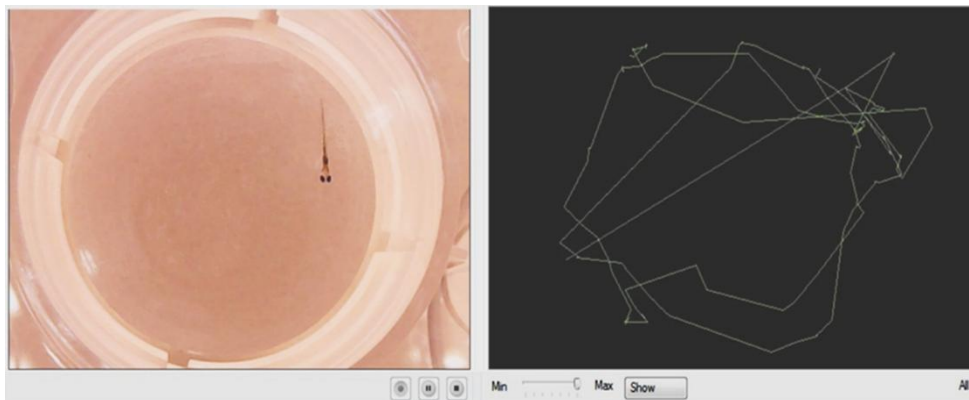
Em 144 horas pós-fertilização, foram filmadas 10 larvas de cada grupo, por meio de um microscópio digital associado a uma plataforma de iluminação, como demonstrado na Figura 2, porém utilizando as mesmas microplacas da exposição, em vez de placas de Petri. Posteriormente, foi realizada a análise do comportamento por meio do software *sacam*[®] (Jorge *et al.*, 2005), considerando os parâmetros: velocidade, distância percorrida e tempo de movimento por um período total de 2 minutos em cada poço individualmente, como demonstrado na Figura 3.

Figura 2 – Microscópio digital (A), associado a uma plataforma de iluminação (C) para fotografia das amostras em placa de Petri (B) ou filmagens em microplacas.



Fonte: (Cuenca *et al.*, 2021).

Figura 3 – Análise do comportamento larval de *Danio rerio*, pelo software sacam.



Fonte: (Cuenca *et al.*, 2021).

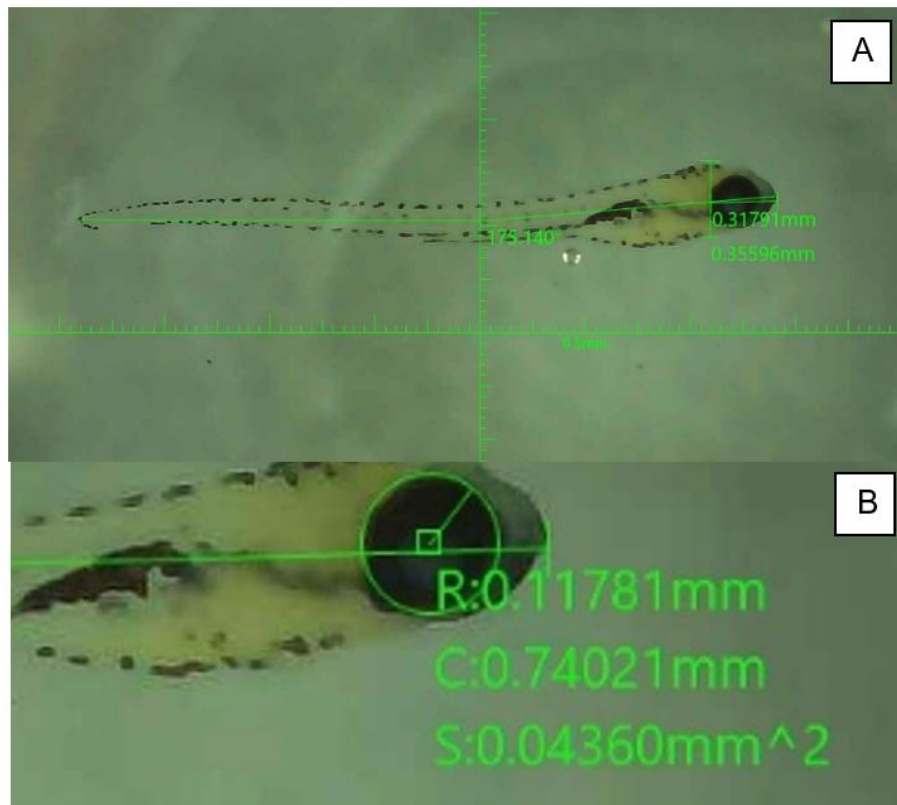
3.5 BIOMETRIA NO ESTÁGIO LARVAL

Após a filmagem do comportamento, as larvas foram fixadas em fixador Dietrich (30ml de etanol 95%, 10ml de formalina, 2ml de ácido acético e 58ml de água destilada) para posterior biometria (Lillie, 1965).

As medidas biométricas foram feitas por meio do software HiView®, em que foram levadas as medidas em consideração para definir alterações de

desenvolvimento e/ou teratogênicas no estágio larval foram: comprimento total do corpo, comprimento da cabeça, altura da cabeça e diâmetro ocular, conforme demonstrada na Figura 4. Além do comprimento total e do diâmetro ocular, foram calculadas e consideradas como parâmetros as razões de comprimento da cabeça/comprimento total e comprimento/altura da cabeça (proporção cefálica). Medidas que se mostraram redundantes com o diâmetro do olho, como circunferência e área ocular, não foram consideradas.

Figura 4 - A) Medidas biométricas – comprimento total, comprimento e altura da cabeça (indivíduo normal, não exposto); **B)** Medidas biométricas – raio, circunferência e área ocular (indivíduo normal, não exposto).



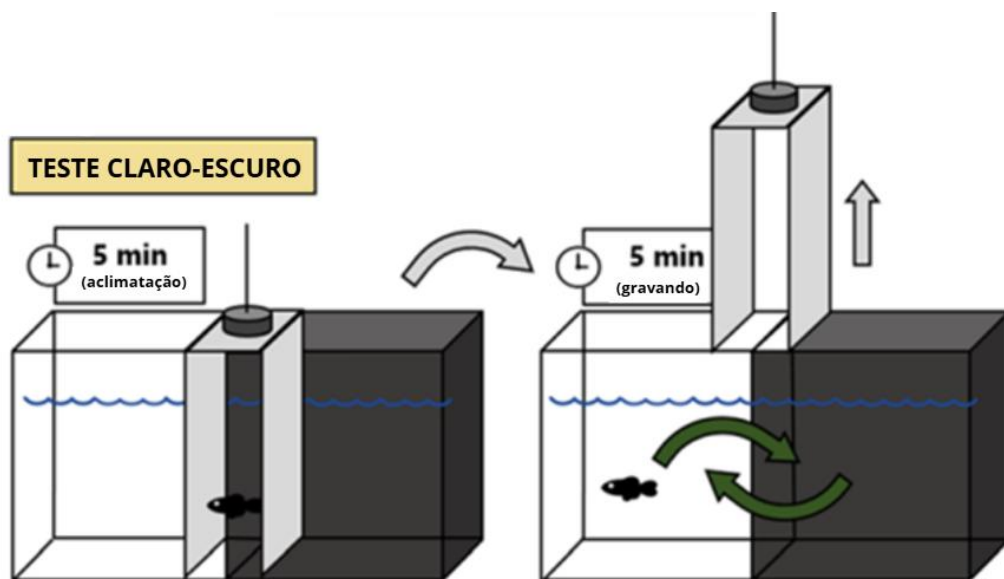
Fonte: a própria autora.

3.6 TESTE DE CLARO-ESCURO

O teste claro-escuro é conhecido como um parâmetro comportamental para avaliar estresse, ansiedade e comportamento exploratório de animais, de modo que a ocupação maior do compartimento claro e maior movimentação indicam menor nível de ansiedade. (Levin *et al.*, 2007). Para isto foi utilizado um aquário de 50 cm de comprimento, 19 cm de altura e 10 cm de largura, dividido em um compartimento claro

e outro escuro, com um pequeno espaço entre eles separado por uma divisória móvel, onde o peixe foi inicialmente inserido, como demonstrado na Figura 5. Neste experimento foram realizadas filmagens com o software Geovision® com tomada superior, de modo a mostrar os dois lados do aquário (claro e escuro). As filmagens tiveram duração de 10 minutos, sendo os primeiros 5 minutos considerados como aclimação ao aquário-teste. Passados 5 minutos de filmagem, a divisória era suspensa para que o peixe ocupasse livremente o aquário, e a primeira escolha entre ambiente claro ou escuro era anotada. Assistindo aos vídeos e utilizando o aplicativo *Countee* foi registrado o tempo gasto no lado escuro e claro, em segundos e em porcentagem, e o número de transições entre os compartimentos. Também foi possível analisar neste teste o tempo médio investido em cada lado e o tempo de latência para a primeira escolha.

Figura 5 - Desenho esquemático do teste de claro-escuro.



Fonte: (adaptado de Cuenca *et al.*, 2021).

3.7. TESTE DE NATAÇÃO ESPONTÂNEA

No teste de natação espontânea os peixes foram inseridos individualmente em aquário de formato trapezoidal, tipo *novel tank*, com 17 cm de altura (nível da coluna d'água), 24,5 cm de comprimento (maior lado) e 5 cm de largura. A atividade natatória foi filmada por dez minutos, sendo os 5 primeiros minutos considerados de aclimação ao aquário, demonstrado na Figura 6. Neste teste são analisados o

estrato de preferência, distância total percorrida, a velocidade média, o tempo de movimento e a ocupação da coluna d'água. As filmagens foram realizadas com o software Geovision® e o rastreamento dos movimentos foi feito com o auxílio do Software Sacam® (Jorge *et al.*, 2005).

Figura 6 - Desenho esquemático do teste de natação espontânea.



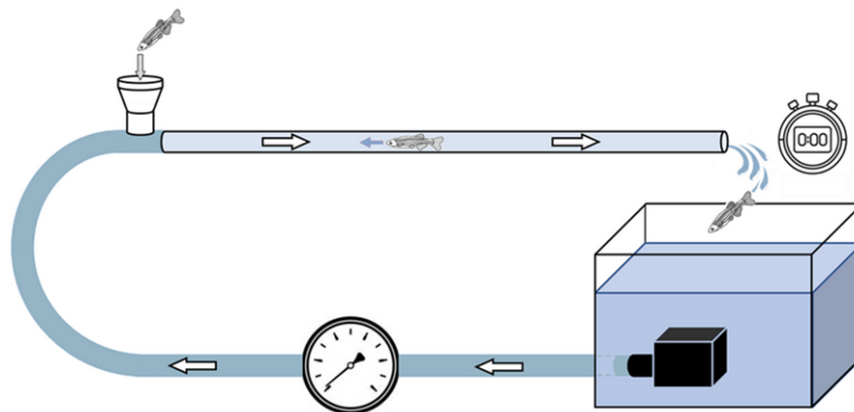
Fonte: (adaptado de Cuenca *et al.*, 2021).

3.8. TESTE DE RESISTÊNCIA NATATÓRIA

Para a realização desse experimento foi utilizado um sistema fechado composto por um túnel de natação, uma bomba d'água com vazões mecanicamente controladas, de acordo com o desenvolvido por Melo (2011) e adaptado (Cuenca *et al.*, 2021), demonstrado na Figura 7. O peixe foi inserido no sistema e sua natação foi medida contracorrente, com velocidade inicial de 2 L.min⁻¹, por um minuto, considerada aclimatação. Em seguida, as velocidades foram incrementadas em 1 L.min⁻¹ até a fadiga do animal ou o fluxo máximo de 12 L.min⁻¹. O resultado deste teste foi sistematizado em um Índice de Resistência Natatória (IRN) de cada peixe, de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{IRN} = \sum \text{Vazões suportadas} + \frac{\text{tempo (s) na última vazão suportada}}{60} \times \text{Última Vazão suportada}$$

Figura 7 - Desenho esquemático do teste de resistência natatória.



Fonte: (modificado de Yamasaki, 2024).

3.9. BIOMETRIA E DETERMINAÇÃO DA GLICEMIA

Após o teste de resistência natatória, os peixes foram eutanasiados por imersão em benzocaína (1g.L^{-1}), e foi coletada amostra de sangue por secção caudal para determinação da glicemia (mg/dL) por meio de glicosímetro portátil (Freestyle Optium Neo®) e realizada a biometria dos indivíduos, conforme demonstrado as médias na Tabela 3.

Tabela 3 – Medidas biométricas: peso (Wt), comprimento total (Lt) e comprimento padrão (Ls), e glicemia (mg/dL), em médias dos grupos experimentais CTR, PAR 0,5, PAR 5 e PAR 50, em adultos de *Danio rerio* após exposição de 96h e testes comportamentais.

Grupo	Wt (g)	Lt (cm)	Ls (cm)	Glicemia (mg/dL)
CTR	$0,39 \pm 0,13$	$3,49 \pm 0,27$	$2,53 \pm 0,31$	$69,47 \pm 33,44$
PAR 0,5	$0,39 \pm 0,15$	$3,47 \pm 0,33$	$2,41 \pm 0,33$	$65,67 \pm 28,73$
PAR 5	$0,35 \pm 0,13$	$3,37 \pm 0,24$	$2,57 \pm 0,28$	$74,07 \pm 49,44$
PAR 50	$0,39 \pm 0,14$	$3,47 \pm 0,22$	$2,60 \pm 0,23$	$72,07 \pm 38,14$

Fonte: a própria autora.

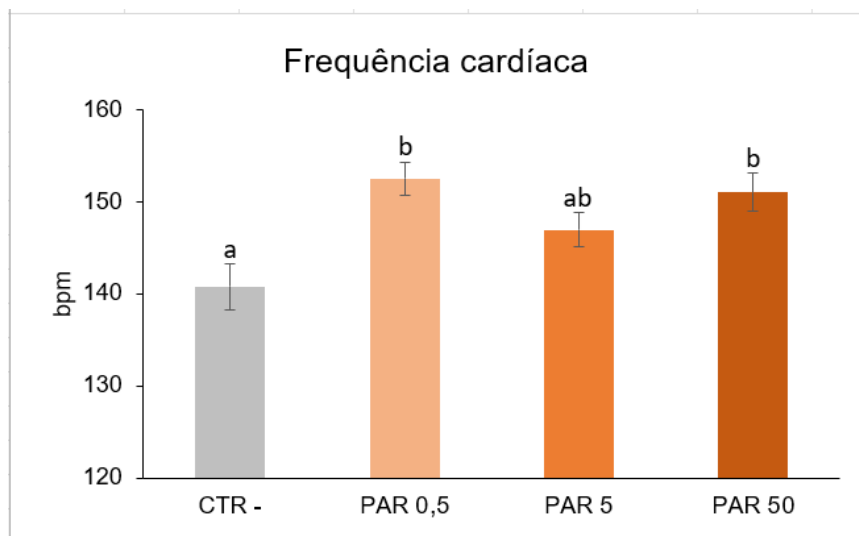
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os parâmetros físico-químicos da água apresentaram valores dentro da normalidade durante a exposição, conforme demonstrados na Tabela 1.

A análise estatística foi feita pelo Sigma-Plot, em que foi utilizada para a maioria dos parâmetros ANOVA, seguida do teste de comparações múltiplas SNK, em caso de distribuição normal dos dados, teste de Kruskal-Wallis. No teste de preferência por estrato, dentro de um mesmo tratamento, utilizado teste de T de Student. Em que todas as análises foram considerados significativos valores de $p < 0,05$.

No teste FET não foram observadas alterações nos parâmetros padrões da norma OECD 236 (OECD, 2013). No entanto, foram observadas reduções significativas na frequência cardíaca nos grupos experimentais, com exceção de PAR 5, conforme demonstrado no Gráfico 1.

Gráfico 1: Frequência cardíaca em batimentos por minuto (bpm) analisada durante o teste FET em embriões de *D. rerio* com 96 hpf expostos ao paracetamol nas concentrações testadas. Os resultados estão apresentados como médias e erros-padrão; letras minúsculas apontam as diferenças significativas entre os grupos. Foram considerados significativos valores de $p < 0,05$.



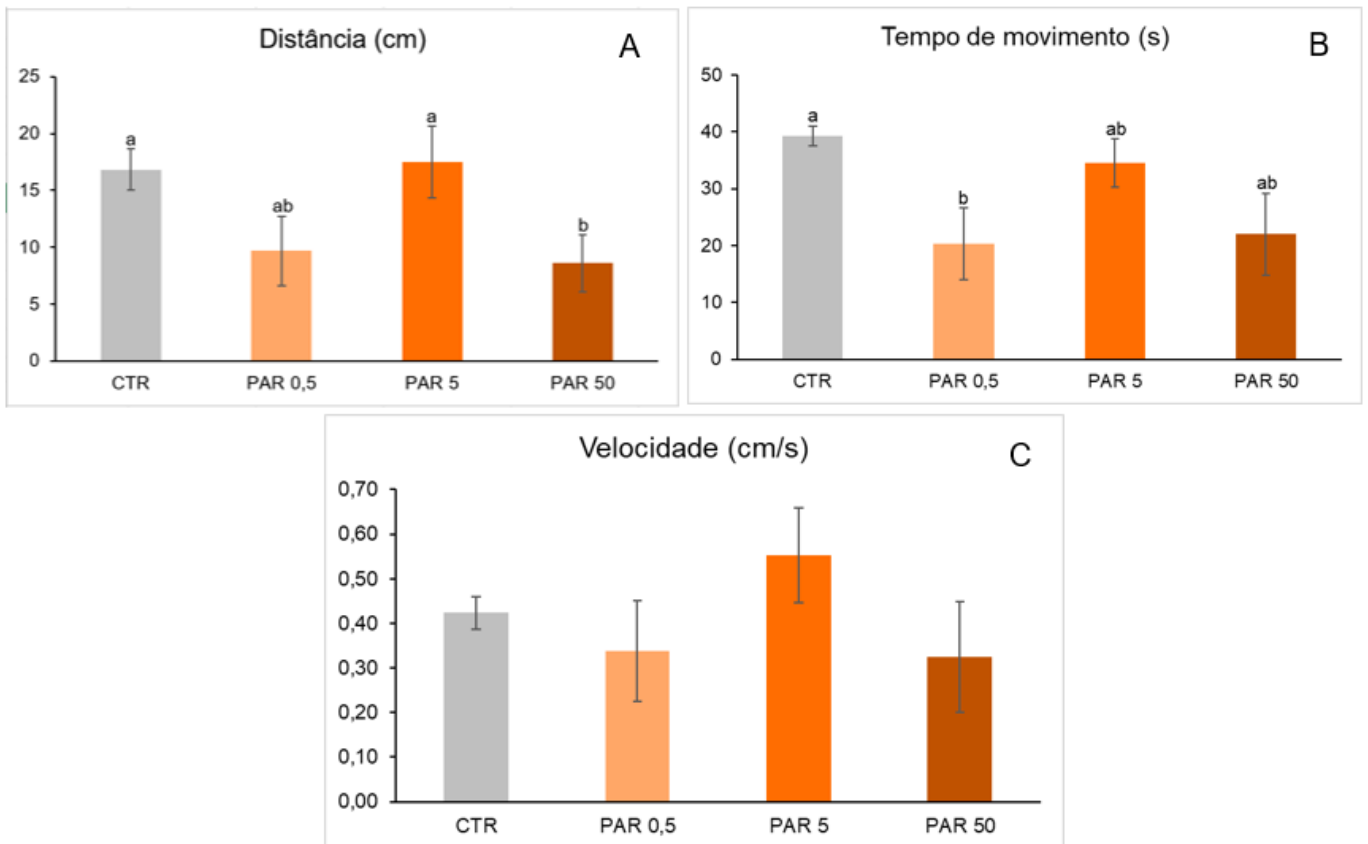
Fonte: a própria autora.

Os resultados da análise da frequência cardíaca das larvas de *Danio rerio* durante o teste FET esteve em concordância com o estudo de Chabchoubi e colaboradores (2023), no qual a exposição ao paracetamol elevou a frequência

cardíaca dos embriões com 48, 72 e 96 hpf expostos às concentrações de 1,25; 2,5; 5,75 e 11,25 mg/L. É importante frisar que as concentrações utilizadas no presente trabalho foram de, aproximadamente, 500 a 2000 ordens de grandeza menores que no trabalho citado.

Na análise do comportamento natatório do estágio larval, foram analisados os parâmetros de distância (cm), com redução no grupo PAR 50 comparado aos grupos CTR e PAR 5. Já, na análise de tempo de movimento (s), apenas o grupo PAR 0,5 apresentou diminuição com relação ao controle. Quanto à de velocidade (cm/s), não houve diferenças significativas entre os grupos, conforme demonstrado no Gráfico 2.

Gráfico 2: Comportamento natatório das larvas em 144hpf: **A)** distância (cm); **B)** tempo de movimento (s); **C)** velocidade (cm/s). Os resultados estão apresentados nas figuras como médias e erros-padrão. Foram considerados significativos valores de $p < 0,05$.



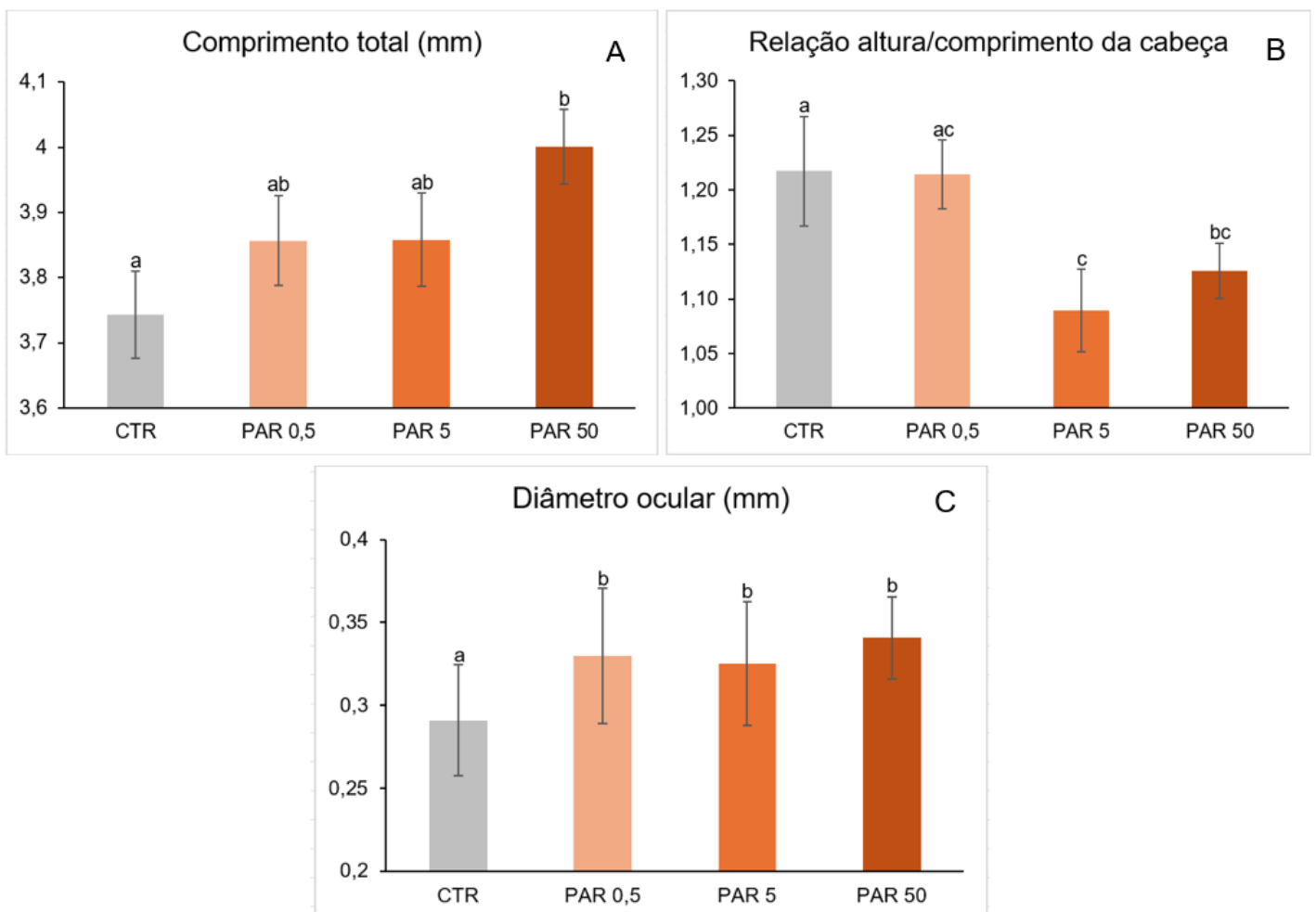
Fonte: a própria autora.

Assim, de maneira geral, observamos diminuição de atividade natatória na

maior e na menor concentração de paracetamol, o oposto ao observado por Nogueira et al. (2019), em que larvas de *D. rerio* (144 hpf) aumentaram a atividade natatória quando expostas a concentrações que variaram de 0,005 a 3,125 mg.L⁻¹, concentrações, portanto, muito superiores às do presente estudo.

As análises biométricas revelaram aumento do comprimento total em PAR 50, diminuição na relação altura/comprimento da cabeça em PAR 5 e PAR 50, indicando a ocorrência de braquicefalia nas larvas desses grupos. Além disso, houve aumento no diâmetro ocular das larvas dos três grupos com paracetamol, conforme demonstrado no Gráfico 3.

Gráfico 3: Análises biométricas das larvas em 144hpf: **A)** comprimento total (mm); **B)** relação altura/comprimento da cabeça (mm); **C)** diâmetro ocular (mm). Os resultados estão apresentados nas figuras como médias e desvios-padrão. Foram considerados significativos valores de $p < 0,05$.



Fonte: a própria autora.

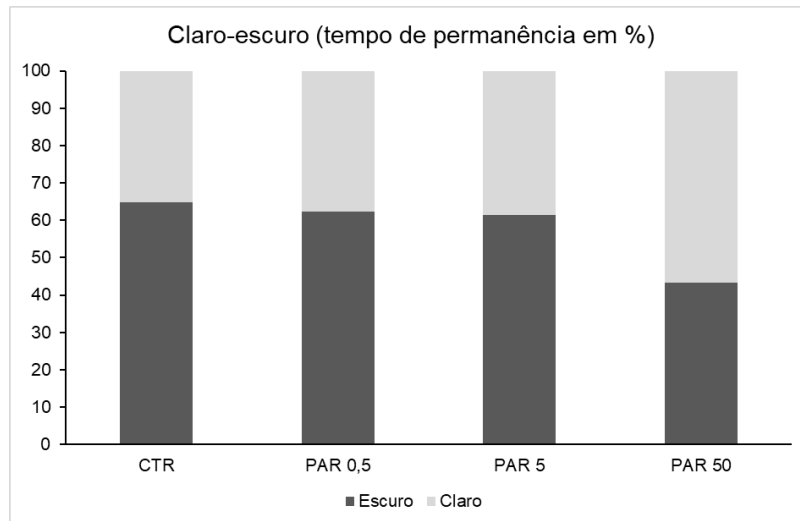
No estudo de Chabchoubi e colaboradores (2023) também foi analisado o diâmetro ocular, porém em embriões de *D. rerio* expostos ao diclofenaco, um fármaco também não esteroide, utilizado para tratar dores inflamatórias e febre, similar ao paracetamol. Os autores observaram uma redução drástica do diâmetro ocular das larvas, diferentemente do presente trabalho, em que as larvas de *D. rerio* apresentaram um aumento do diâmetro nos grupos expostos.

Os resultados obtidos nas análises biométricas das larvas de *Danio rerio* foram semelhantes ao estudo desenvolvido por Rosas-Ramírez e colaboradores (2022), que combinou o paracetamol com a ciprofloxacina, outro fármaco bastante utilizado, e essa mistura induziu alterações morfológicas nos embriões, como malformações craniofaciais, além de escoliose, hipopigmentação, retardo do crescimento e edema pericárdico, além de ter reduzido a taxa de sobrevivência em até 75%. Nogueira *et al.* (2019) também observaram deformações morfológicas e outras alterações, como falta de pigmentação, flexão anormal da coluna e alteração do equilíbrio das larvas diferentemente das encontradas neste projeto, no qual hipopigmentação e alteração no equilíbrio das larvas não foram detectados. Novamente é importante ressaltar que as concentrações utilizadas pelos autores desse estudo foram extremamente mais elevadas (0.005, 0.025, 0.125, 0.625, e 3.125 mg/L de paracetamol) do que as testadas no presente trabalho.

Com relação aos experimentos com *D. rerio* em estágio adulto, também não foi observada mortalidade durante as 96 horas de exposição. Entretanto, ressalta-se que, no grupo PAR 50, durante a realização dos testes comportamentais, houve morte de um indivíduo (P8) no teste de resistência natatória.

No teste claro-escuro não houve diferença estatística significativa entre os grupos, com relação ao tempo de permanência em cada lado conforme demonstrado no Gráfico 4. Na análise de primeira escolha, resultou em 53,33% (8 peixes de 15) de primeiras escolhas no lado claro nos grupos CTR, PAR 0,5 e PAR 50, apenas o PAR 5 demonstrou 46,67% (7 peixes de 15) de primeiras escolhas no lado claro, mantendo assim as escolhas na média.

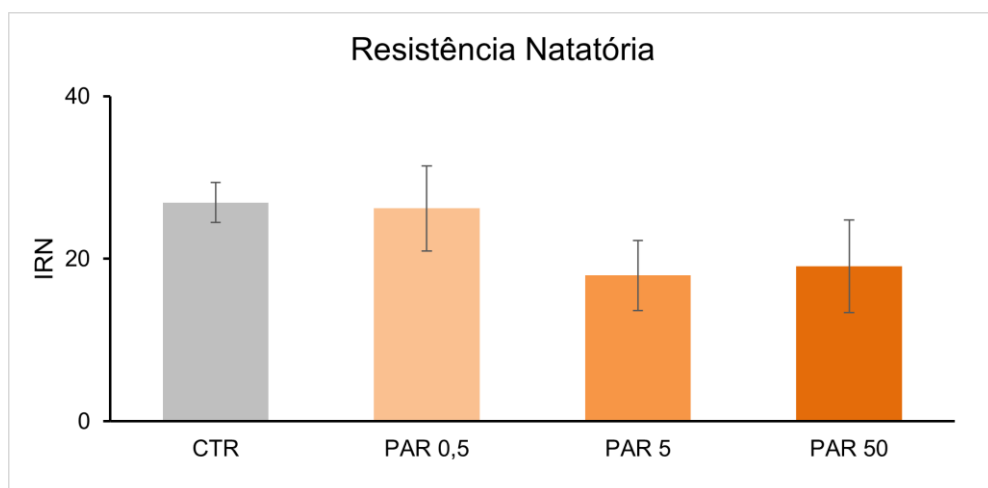
Gráfico 4: Tempo de permanência dos peixes nos lados claro e escuro. As barras representam o percentual do tempo de ocupação dos indivíduos em cada um dos lados. Foram considerados significativos $p < 0,05$.



Fonte: a própria autora.

Também não houve diferenças significativas no teste de Resistência Natatória, conforme demonstrado no Gráfico 5.

Gráfico 5: Teste de Resistência Natatória. Os valores representam as médias do Índice de Resistência Natatória (IRN) e, as linhas verticais, os erros-padrão. Foram considerados significativos $p < 0,05$.

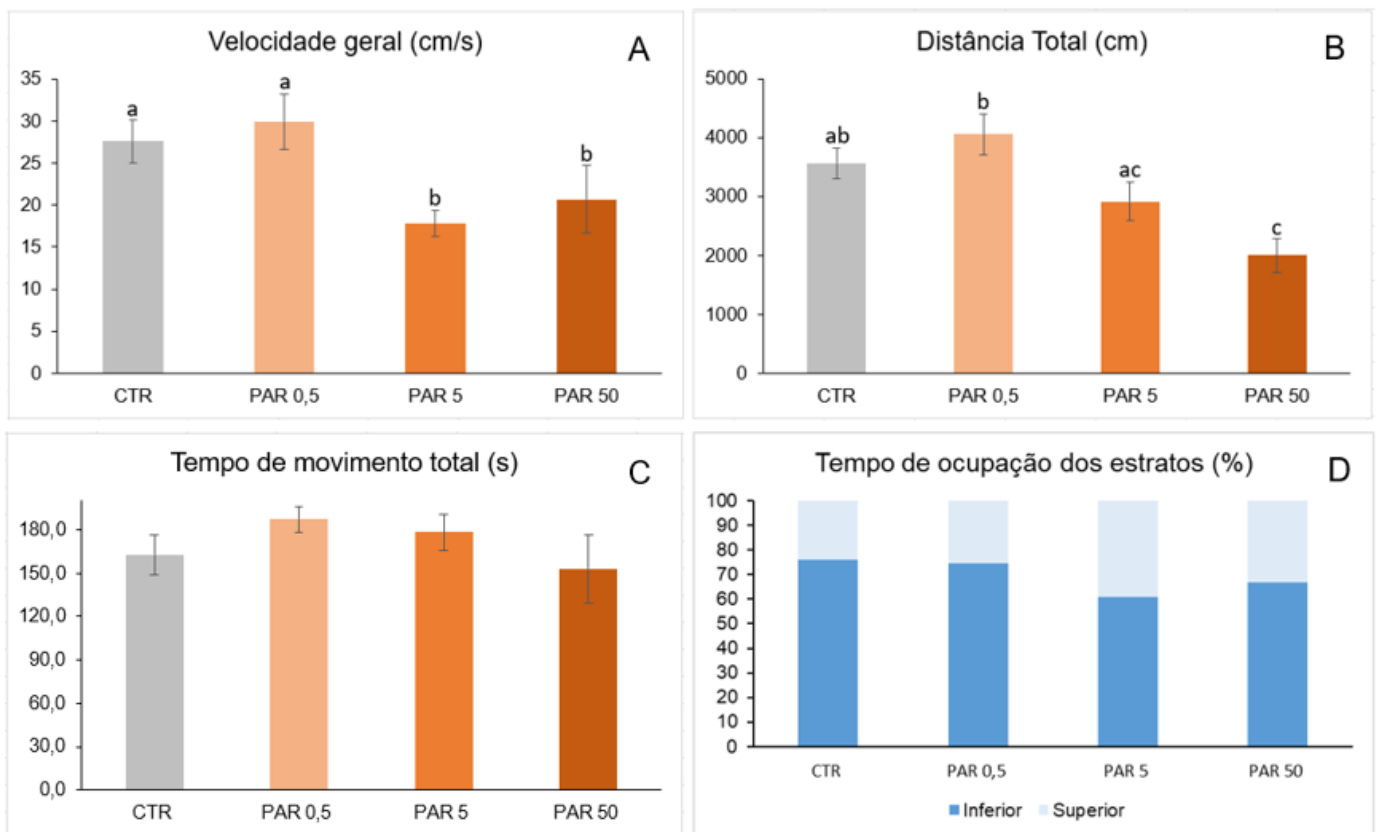


Fonte: a própria autora.

Porém, o teste de natação espontânea indicou diminuição na velocidade nos grupos PAR 5 e PAR 50, com relação ao CTR e PAR 0,5. Quanto à distância total,

houve redução somente no grupo PAR 50, quando comparado ao CTR e PAR 0,5. Já as análises de tempo de movimento total (s) e de tempo de ocupação nos estratos (%) não indicaram diferenças significativas entre os grupos, conforme demonstrado no Gráfico 6.

Gráfico 6: Parâmetros de Natação Espontânea dos peixes adultos: **A)** velocidade geral (cm/s); **B)** distância total (cm); **C)** tempo de movimento total (s); **D)** tempo de ocupação nos estratos (%). Os resultados estão apresentados nas figuras como médias e erros-padrão. Foram considerados significativos valores de $p < 0,05$.



Fonte: a própria autora.

Os testes comportamentais realizados com os adultos de *D. rerio*, indicaram que a menor distância percorrida pelos peixes na maior concentração foi devida à menor velocidade de natação, uma vez que o tempo de movimento não variou significativamente. Embora a ocupação dos estratos e o teste claro-escuro não tenham apontado comportamento tipo-ansioso, a menor atividade natatória pode ser um indicativo de um ligeiro efeito ansiogênico. No entanto, Giacomini *et al.* (2021)

observaram efeitos ansiolíticos, mas em concentrações muito mais elevadas de paracetamol (de 30 a 750 mg/L) testadas em adultos de *D. rerio* em *novel tank* (natação espontânea), com aumento da distância e tempo de permanência no estrato superior. É importante considerar, no entanto, que em doses elevadas, muitos fármacos, em especial os psicotrópicos, podem provocar efeitos que passam da ansiólise para a sedação (Suryanto *et al.*, 2021), ou seja, respostas bifásicas. Como exemplos desse tipo de efeito, podemos citar o estudo de Magno e colaboradores (2015), no qual testes realizados com o clonazepam, um fármaco com efeito ansiolítico, demonstraram efeito de redução de ansiedade de *D. rerio* no teste claro-escuro, diminuindo o tempo gasto no compartimento escuro (efeito ansiolítico) e, com o aumento da concentração, diminuição do número de trocas entre os lados (efeito ansiogênico). Já os testes com imaprina e fluoxetina, classificados como antidepressivos, aumentaram o tempo no lado escuro e a latência, e reduziram as travessias, nas concentrações de 1, 2 e 4 mg/L, efeitos ansiogênicos, mas que podem ser interpretados também como sedativos.

Testes feitos com indometacina, um anti-inflamatório também não esteroide, utilizado para tratar dores e sérias inflamações, mas com ações diferentes às do paracetamol, apresentaram resultados com efeitos agravantes da ansiedade, reduzindo em até 80% do tempo no estrato superior, com concentrações de 1 a 3 mg/kg (Pinheiro *et al.*, 2024).

Em concordância com o presente trabalho, foi observado que testes com paracetamol não intensificaram comportamentos semelhantes a ansiedade no teste do claro-escuro em ratos (Kirsten *et al.*, 2019).

Por outro lado, estudos de resistência em humanos que utilizaram paracetamol indicaram um maior desempenho em atividades físicas após o consumo, promovendo um efeito ergogênico, principalmente se tomado de 30 a 60 minutos antes da prática do exercício (Grgic, 2022). Porém, em outro trabalho, não foi demonstrada nenhuma diferença na fisiologia, percepção e desempenho físico de triatletas treinados a condições quentes e úmidas com o uso de paracetamol (Wijekulasuriya *et al.*, 2022). Assim, parece não haver consenso sobre os efeitos do paracetamol em testes de desempenho físico em humanos. Em ambos os casos, a administração foi por ingestão, diferentemente dos realizados com peixes, feita por imersão. De todo modo, o uso de animais modelo na avaliação do efeito de fármacos é útil no sentido de que as doses e as condições dos testes podem ser melhor controladas.

Assim, é necessária a realização de mais estudos que testem o efeito do paracetamol em organismos modelos em diferentes concentrações e tempos de exposição, para que sejam conhecidos os efeitos provocados quando ocorre o descarte inadequado do fármaco que, conseqüentemente, poderá atingir os corpos d'água com potenciais danos sobre a biota aquática. Além disso, é importante promover uma legislação ambiental para o descarte de fármacos nestes ambientes e buscar soluções de retirada de contaminantes, como os fármacos, dos efluentes aquáticos.

5. CONCLUSÕES

É aceita a hipótese do trabalho, pois a exposição aguda ao paracetamol, mesmo em concentrações baixas ambientalmente relevantes, foi capaz de induzir alterações significativas no desenvolvimento, como na função cardíaca embrionária, e no comportamento natatório de larvas e adultos de *Danio rerio*.

Além disso, foram observadas as alterações nas medidas e relações biométricas nas larvas, como aumento do comprimento total e do diâmetro ocular, além de braquicefalia, indicando potencial impacto teratogênico do fármaco.

Os parâmetros utilizados além dos considerados na norma OECD 236 (2013), ou seja, as relações biométricas, a avaliação da atividade natatória das larvas e a determinação da frequência cardíaca mostraram-se bastante sensíveis em detectar alterações mesmo em concentrações ambientais bem inferiores às que outros trabalhos testaram. Assim, o uso desses parâmetros adicionais de análise deve ser considerado em futuros estudos.

Nos adultos, a redução da velocidade e distância de natação sugere um possível efeito ansiogênico, em concentrações mais altas, embora o teste claro-escuro não tenha indicado diferenças significativas entre os grupos.

Os resultados reforçam a sensibilidade do *D. rerio* como organismo modelo para estudos ecotoxicológicos, em análises de desenvolvimento embriolarval e de comportamento, alertando para os efeitos subletais de fármacos encontrados em corpos d'água, como o paracetamol.

Para avançar na compreensão desses impactos, recomenda-se a realização de novos estudos que variem tempos de exposição e concentrações, incorporem outros organismos modelos e utilizem biomarcadores para esclarecer os mecanismos moleculares e fisiológicos associados aos efeitos descritos.

REFERÊNCIAS

AUS DER BEEK, T; WEBER, F. A; BERGMANN, A; HICKMANN, S; EBERT, I; HEIN, A; KUSTER, A. Pharmaceuticals in the environment - Global occurrences and perspectives. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 2016.

BARBOSA, I; PIZARRO, I; FREITAS, R; NUNES, B. Antioxidative and neurotoxicity effects of acute and chronic exposure of the estuarine polychaete *Hediste diversicolor* to paracetamol. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 2020.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução nº 285, de 7 de março de 2024. “Define a Lista de Medicamentos Isentos de Prescrição.” Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-in-n-285-de-7-de-marco-de-2024-547762853> Acesso em: 06 maio 2025.

BUCARETCHI, F; FERNANDES, C.B; BRANCO, M.M; DE CAPITANI, E.M; HYSLOP, S; CALDAS, J.P; MORENO, C.A; PORTA, G. Acute liver failure in a term neonate after repeated paracetamol administration. **Revista Paulista de Pediatria**, 2014.

CANEDO, A; ROCHA, T. L. Zebrafish (*Danio rerio*) using as model for genotoxicity and DNA repair assessments: Historical review, current status and trends. Laboratory of **Environmental Biotechnology and Ecotoxicology**, 2021.

CHABCHOUBI, I. B; BOUCCHIMA, R. A; LOUHICHI, N; BAANANNOUC, A; MASMOUDI, S; HENTATI, O. Short-term effects of various non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) on *Danio rerio* embryos. **MethodsX**, 2023.

CUENCA, L. R. A; SIMONATO, D. J; MELETTI, C. P. Acute exposure of embryo, larvae and adults of *Danio rerio* to fipronil commercial formulation reveals effects on development and motor control. **Ecotoxicology**, 2021.

EBELE, Anekwe Jenni; ABDALLAH, Mohamed Abou-Elwafa; HARRAD, Stuart. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in the freshwater aquatic environment. **Emerging Contaminants**, Volume 3, Issue 1, 2017, Pages 1-16.

ELIZALDE-VELÁZQUES, G.A; ROSAS-RAMÍREZ, J.R; RALDUA, D; GARCÍA-MEDINA, S; OROZCO-HERNÁNDEZ, J.M; ROSALES-PÉREZ, K; ISLAS-FLORES, H; GALAR-MARTÍNEZ, M; GUZMÁN-GARCÍA, X; GÓMEZ-OLIVÁN, L.M. Low concentrations of ciprofloxacin alone and in combination with paracetamol induce oxidative stress, upregulation of apoptotic-related genes, histological alterations in the liver, and genotoxicity in *Danio rerio*. **Chemosphere**, 2022 May; 294:133667.

FARIA, Gabriel Batista de. Review of anatomy and main organs of Zebrafish (*Danio rerio*). Completion of course work (Specialization in Vivariums) – **Escola Superior do Instituto Butantan**, São Paulo, 2022.

FONTANA, B.D; CLEAL, M; PARKER, M.O. Female adult zebrafish (*Danio rerio*) show higher levels of anxiety-like behavior than males, but do not differ in learning and memory capacity. **European Journal of Neuroscience**, 2020.

GIACOMINI, A.C.V.V; SCOLARI, N; MARCON, L; BUENO, B.W; DOS SANTOS, B.E; DEMIN, K.A; KALUEFF, A.V; DE ABREU, M.S. Putative anxiolytic-like behavioral effects of acute paracetamol in adult zebrafish. **Behavioural Brain Research**, 2021. Jul 9; 409:113293.

GRGIC, J. What is the Effect of Paracetamol (Acetaminophen) Ingestion on Exercise Performance? Current Findings and Future Research Directions. **Sports Medicine**, 2022. Mar;52(3):431-439.

GUTIÉRREZ-NOYA, V. M; GÓMEZ-OLIVÁN, L. M; RAMÍREZ-MONTERO, M. D. C; ISLAS-FLORES, H; GALAR-MARTÍNEZ, M; GARCÍA-MEDINA, S. Survival and malformations rates, oxidative status in early life stages of *Cyprinus carpio* due to exposure to environmentally realistic concentrations of paracetamol. **Science of The Total Environment**, 2021.

HAMMER, Cornelius. Fatigue and exercise tests with fish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v. 112, n. 1, p. 1-20, 1995.

JORGE, L. A. C.; LAUMANN, R.; BORGES, M.; MORAES, M. C. B.; CRUZ, R. A.; MILARE, B. N.; PALHARES, L. **Software para avaliação do comportamento de insetos**. 1. ed. São Carlos: Embrapa CNPDIA, 2005. (Circular Técnica, 30).

KACHANOV, D; ELISTRATOV, L; GUSEINOV, H; BALAEVA, K; POPOVA, N. A Comparative Review of the Use of *Danio rerio* (zebrafish) as a Model Object in Preclinical Studies. **Georgian Medical News**, 2023.

KILLEN, S. S. REID, D; MARRAS, S; DOMENICI, P. The interplay between aerobic metabolism and antipredator performance. **Journal of Experimental Biology**, 2012.

KIRSTEN, T.B; CABRAL, D; GALVÃO, M.C; MONTEIRO, R; BONDAN, E.F; BERNARDI, M. Zinc, but not paracetamol, prevents depressive-like behavior and sickness behavior, and inhibits interferongamma and astrogliosis in rats, **Brain, Behavior, and Immunity**, 2020.

LARS, B; BEATA, F. G. Biology and research applications. In: Laboratory Fish in Biomedical Research. **Academic Press**, 2022.

LEVIN, E. D. BENCAN, Z; CERUTTI, D. T. Anxiolytic effects of nicotine in zebrafish. **Physiology & Behavior**, v. 90, n. 1, p. 54-58, 2007.

LIU, S; DING, R; NIE, X. Assessment of oxidative stress of paracetamol to *Daphnia magna* via determination of Nrf1 and genes related to antioxidant system. **Aquatic Toxicology**, 2019.

LILLIE, R. D. **Histopathologic technic and practical histochemistry**. 3. ed. New York: McGraw-Hill, 1965.

MAGNO, L. D. P; FONTES, A; GONÇALVES, B. M. B; GOUVEIA JUNIOR, A. Pharmacological study of the light/dark preference test in zebrafish (*Danio rerio*): Waterborne administration, **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, 2015.

MELO, F. R. M. **Avaliação dos efeitos do hidrocarboneto aromático fenantreno e do metal cobre em juvenis do peixe Poecilia vivipara**. 2011. Dissertação Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal. Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

NASCIMENTO, R. F; DE CARVALHO FILHO J. A. A; NAPOLEÃO D. C; RIBEIRO, B. G; DA SILVA, J. J. P. C; DE PAIVA, A. L. R. Presence Of Non-Steroidal Anti-Inflammatories In Brazilian Semiarid Waters. **Water, Air e Soil Pollution**, 2023.

NOGUEIRA, A. F; PINTO, G; CORREIA, B; NUNES, B. Embryonic development, locomotor behavior, biochemical, and epigenetic effects of the pharmaceutical drugs paracetamol and ciprofloxacin in larvae and embryos of *Danio rerio* when exposed to environmental realistic levels of both drugs. **Environmental toxicology**, 2019.

PALSTRA, A. P; VAN DEN THILLART, G. E. E. J. M. Swimming physiology of European silver eels (*Anguilla anguilla*): Energy cost of transport and the effects of reproductive migration. **PLOS ONE**, 2015.

Paracetamol. [bula-prof-648336-LEG-v0]. MG- Sabará: HIPOLABOR FARMACÊUTICA. Disponível em: <https://consultas.anvisa.gov.br/#/bulario/q/?nomeProduto=paracetamol>. Acesso em 06 maio 2025.

PEI, D. S; STRAUSS, P. R. Zebrafish as a model system to study DNA damage and repair. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 743–744, p. 151–159, 2013.

PERUSSOLO, M.C; VICENTINI, M; LYRA, L. S; SILVA, L. A; RODRIGUES, M. S; FERNANDES, L. S. P; FÁVARO, L. F; ASSIS, H. C. S. A multibiomarker approach to investigate paracetamol effects in the reproduction regulatory axis of a male neotropical catfish *Rhamdia quelen*. **Acta Limnologica Brasiliensia**, 2023, vol. 35, e27.

PINHEIRO, J; PINHEIRO, E; DE DEUS, G.R; SAITO, G; LUZ, W.L; ASSAD, N; DA CUNHA PALHETA, M.R; DE JESUS, E. O. B; MORAIS, S; PASSOS, A; OLIVEIRA, K.R.H.M; HERCULANO, A.M. Brain oxidative stress mediates anxiety-like behavior induced by indomethacin in zebrafish: protective effect of alpha-tocopherol. **Naunyn Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, 2024. Mar;397(3):1715-1725.

ROSAS-RAMÍREZ, Jonathan Ricardo; OROZCO-HERNÁNDEZ, José Manuel; ELIZALDE-VELÁZQUEZ, Gustavo Axel; RALDÚA, Demetrio; ISLAS-FLORES, Hariz; GÓMEZ-OLIVÁN, Leobardo Manuel. Teratogenic effects induced by paracetamol, ciprofloxacin, and their mixture on *Danio rerio* embryos: Oxidative stress implications. **Science of The Total Environment**, Volume 806, Part 2, 2022.

SURYANTO, M.E.; AUDIRA, G.; UAPIPATANAKUL, B.; HUSSAIN, A.; SAPUTRA, F.; SIREGAR, P.; CHEN, K.H.C.; HSIAO, C.D. Antidepressant Screening Demonstrated Non-Monotonic Responses to Amitriptyline, Amoxapine and Sertraline in Locomotor Activity Assay in Larval Zebrafish? **Cells**, 2021, v.10, p.738.

WIJEKULASURIYA, G.A; COFFEY, V.G; BADHAM, L; O'CONNOR, F; SHARMA, A.P; COX, G.R. Effect of Acetaminophen on Endurance Cycling Performance in Trained Triathletes in Hot and Humid Conditions. **International Journal of Sports Physiology and Performance**, 2022. Mar 3;17(6):917-925.

YAMASAKI, Alice. **Avaliação do Efeito de Sólidos Suspensos por Meio de Análises Fisiológicas e Comportamentais em Peixes**. 2025. 49 fls. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2025.