

**INSTITUTO FEDERAL GOIANO, CAMPUS URUTAÍ - GO
LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**CONCENTRAÇÃO AMBIENTAL DE DIAZEPAM REDUZ
ANSIEDADE EM PAULISTINHAS (*Danio rerio*)**

ALUNO: SINDOVAL SILVA DE SOUZA

ORIENTADOR: PROF. DR ANDRÉ LUIS DA SILVA CASTRO

**Urutaí, GO
2021**

SINDOVAL SILVA DE SOUZA

**CONCENTRAÇÃO AMBIENTAL DE DIAZEPAM REDUZ
ANSIEDADE EM PAULISTINHAS (*Danio rerio*)**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Licenciatura em Ciências Biológicas do Instituto Federal Goiano – Campus Urutaí como parte dos requisitos para conclusão do curso de graduação em Licenciatura em Ciências Biológicas sob orientação do Prof. Dr. André Luis da Silva Castro.

**Urutaí, GO
2021**

Sistema desenvolvido pelo ICMC/USP
Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas - Instituto Federal Goiano

S729c Souza, Sindoval Silva de Souza
CONCENTRAÇÃO AMBIENTAL DE DIAZEPAM REDUZ
ANSIEDADE EM PAULISTINHAS (Danio rerio) / Sindoval
Silva de Souza Souza; orientador Dr. André Luis da
Silva Castro Castro. -- Urutai, 2021.
16 p.

Monografia (Graduação em Licenciatura em Ciências
Biológicas) -- Instituto Federal Goiano, Campus
Urutai, 2021.

1. Ecotoxicologia aquática. 2. Medicamentos
psiquiátricos. 3. Toxicidade. 4. Zebrafish. I.
Castro, Dr. André Luis da Silva Castro, orient. II.
Título.

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR PRODUÇÕES
TÉCNICO-CIENTÍFICAS NO REPOSITÓRIO INSTITUCIONAL DO IF GOIANO**

Com base no disposto na Lei Federal nº 9.610/98, AUTORIZO o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, a disponibilizar gratuitamente o documento no Repositório Institucional do IF Goiano (RIIF Goiano), sem ressarcimento de direitos autorais, conforme permissão assinada abaixo, em formato digital para fins de leitura, download e impressão, a título de divulgação da produção técnico-científica no IF Goiano.

Identificação da Produção Técnico-Científica

- | | |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> Tese | <input type="checkbox"/> Artigo Científico |
| <input type="checkbox"/> Dissertação | <input type="checkbox"/> Capítulo de Livro |
| <input type="checkbox"/> Monografia – Especialização | <input type="checkbox"/> Livro |
| <input checked="" type="checkbox"/> TCC - Graduação | <input type="checkbox"/> Trabalho Apresentado em Evento |
| <input type="checkbox"/> Produto Técnico e Educacional - Tipo: _____ | |

Nome Completo do Autor: Sindoval Silva de Souza

Matrícula: 2017101220530249

Título do Trabalho: CONCENTRAÇÃO AMBIENTAL DE DIAZEPAM REDUZ ANSIEDADE EM PAULISTINHAS (Danio rerio)

Restrições de Acesso ao Documento

Documento confidencial: Não Sim, justifique: _____

Informe a data que poderá ser disponibilizado no RIIF Goiano: 15/03/2021

O documento está sujeito a registro de patente? Sim Não

O documento pode vir a ser publicado como livro? [] Sim [X] Não

DECLARAÇÃO DE DISTRIBUIÇÃO NÃO-EXCLUSIVA

O/A referido/a autor/a declara que:

1. o documento é seu trabalho original, detém os direitos autorais da produção técnico-científica e não infringe os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade;
2. obteve autorização de quaisquer materiais inclusos no documento do qual não detém os direitos de autor/a, para conceder ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano os direitos requeridos e que este material cujos direitos autorais são de terceiros, estão claramente identificados e reconhecidos no texto ou conteúdo do documento entregue;
3. cumpriu quaisquer obrigações exigidas por contrato ou acordo, caso o documento entregue seja baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano.

Urutaí , 15/03/2021.

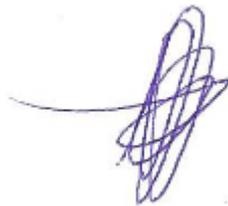
Local

Data

Simdersonal Silva de Souza.

Assinatura do Autor e/ou Detentor dos Direitos Autorais

Ciente e de acordo:



Assinatura do(a) orientador(a)



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SECRETARIA DE EDUCAÇÃO PROFISSIONAL E TECNOLÓGICA
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA GOIANO

Formulário 250/2021 - DE-UR/CMPURT/IFGOIANO

ATA DE APRESENTAÇÃO DE TRABALHO DE CURSO

Às 15:30 horas do dia 12 de março de 2021, reuniu-se

() Por vídeo conferência

a Banca Examinadora do Trabalho de Curso intitulado "Concentração ambiental de diazepam reduz ansiedade em paulistinhas (*Danio rerio*)" composta pelos professores

1 Camila Alves Lopes Cambréa

2 Juliene de Brito Ferreira

3 André Luis da Silva Castro

para a sessão de defesa pública do citado trabalho, requisito parcial para a obtenção do Grau de **Licenciado em Ciências Biológicas**. O Presidente da Banca Examinadora, Prof. André Luis da Silva Castro, passou a palavra ao licenciando (a) Sindoval Silva de Souza para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos membros da Banca Examinadora e respectiva defesa do licenciando. Logo após, a Banca Examinadora se reuniu, sem a presença do(a) licenciado(a) e do público, para expedição do resultado final. A Banca Examinadora considerou que o(a) discente foi

() **APROVADO** / () **NÃO APROVADO** por unanimidade, tendo sido atribuído a nota (9,63) ao seu trabalho. O resultado foi então comunicado publicamente ao(a) licenciando(a) pelo Presidente da Banca Examinadora. Nada mais havendo a tratar, o Presidente da Banca Examinadora deu por encerrada a defesa.

Assinatura dos membros da Banca Examinadora	Notas
1. Camila Alves Lopes Cambréa	10,0
2. Juliene de Brito Ferreira	9,7
3. André Luis da Silva Castro	9,2
Média final:	9,63

Urutaí-GO, 12 de março de 2021

1 Camila Alves Lopes Cambréa

2 Juliene de Brito Ferreira



3 André Luis da Silva Castro

Documento assinado eletronicamente por:

- André Luis da Silva Castro, PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLOGICO, em 12/03/2021 18:10:19.

Este documento foi emitido pelo SUAP em 12/03/2021. Para comprovar sua autenticidade, faça a leitura do QRCode ao lado ou acesse <https://suap.ifgoiano.edu.br/autenticar-documento/> e forneça os dados abaixo:

Código Verificador: 248757

Código de Autenticação: 3cbcc43165



INSTITUTO FEDERAL GOIANO

Campus Urutai

Rodovia Geraldo Silva Nascimento, Km 2,5, Zona Rural, None, URUTAI / GO, CEP 75790-000

(64) 3465-1900

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me concedido esperança, sabedoria, saúde, paz, por ter colocado pessoas tão importantes e especiais no meu caminho e por ter me dado forças para tornar tudo isto possível.

Ao Instituto Federal Goiano – Campus Urutaí, que me proporcionou desenvolvimento acadêmico, profissional e pessoal por meio do curso de Licenciatura em Ciências Biológicas.

Ao meu orientador Prof. Dr. André Luis da Silva Castro pela oportunidade de fazer parte da sua equipe. Agradeço pelo incentivo, apoio, orientação, paciência, confiança e amizade durante os dois anos de Iniciação Científica. Um exemplo de professor/orientador competente que levarei para toda a vida.

Aos professores e servidores do Instituto Federal Goiano – Campus Urutaí e em especial aos professores e servidores do curso de Licenciatura em Ciências Biológicas, e aos colegas de curso.

À minha família que me apoiaram e se dedicaram imensamente para que essa conquista profissional fosse possível, compreendendo minhas ausências nas reuniões familiares. Em especial aos meus pais Maria Helena e Sinval (in memoriam) que me proporcionaram toda a estrutura e suporte para realização de todos meus sonhos.

Aos amigos do Laboratório de Zoologia do Instituto Federal Goiano - Campus Urutaí Camila, Gercino, Juliene e Marcelo pela parceria, apoio, colaboração, conversas e amizade em especial a Camila e a Juliene que foram mais do que amigas foram verdadeiras irmãs dando conselhos e literalmente cuidando de mim nesta jornada tão importante.

Ao CNPq pelo financiamento do projeto de pesquisa.

A todas as pessoas que direta e indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Lista de ilustrações

Figura 1. Comportamento de agressividade em *Danio rerio* comparado em 0h, 24h, 72h e 120h de exposição no teste de espelho durante 5 minutos nos grupos experimentais: Controle (sem diazepam), D1 (0,88 µg/L de diazepam) e D2 (8,8 µg/L de diazepam). (A) Latência para o primeiro ataque. (B) Frequência de ataques. Kruskal-Wallis com pós-teste Tukey. Letras diferentes indicam diferença estatística entre grupos experimentais em cada período (n=18)9

Figura 2. Comportamentos preditivos de ansiedade em *Danio rerio* comparado em 0h, 24h, 72h e 120h de exposição no teste de tanque novo durante 6 minutos nos grupos experimentais: Controle (sem diazepam), D1 (0,88 µg/L de diazepam) e D2 (8,8 µg/L de diazepam). (A) Latência para o primeiro cruzamento. (B) Tempo no topo. (C) Frequência de cruzamentos. Kruskal-Wallis com pós-teste Tukey. Letras diferentes indicam diferença estatística entre grupos experimentais em cada período (n=18)12

Sumário

1. Introdução	2
2. Material e Métodos	4
2.1. Local de estudo	4
2.2. Animal de estudo	4
2.3. Procedimento experimental	5
2.4. Concentração e administração do fármaco	6
2.5. Avaliação dos parâmetros comportamentais	7
2.5.1. Ansiedade	7
2.5.2. Agressividade	7
3. Análises estatísticas	8
4. Resultados	8
4.1. Agressividade	8
4.2. Ansiedade	10
5. Discussão	12
6. Conclusão	13
7. Referências	14

Concentração ambiental de diazepam reduz ansiedade em paulistinhas (*Danio rerio*)

Resumo

Os fármacos são essenciais no tratamento de doenças e para a melhoria da qualidade de vida. Entretanto, estes vêm causando um grave problema ambiental, ocasionado pelo descarte incorreto e pela ineficiência da sua remoção no tratamento de água e esgoto. Esses fármacos podem causar danos em diferentes organismos, os quais são pouco conhecidos. Nosso objetivo foi avaliar os efeitos da exposição aguda de diazepam em baixas concentrações no comportamento do peixe *Danio rerio*. Avaliamos comportamentos preditivos de ansiedade e agressividade, durante uma exposição por 5 dias, com os grupos experimentais: controle e dois grupos expostos ao Diazepam, D1 (0,88 µg/L) e D2 (8,8 µg/L). As duas concentrações de diazepam avaliadas causaram efeito ansiolítico nos peixes, reduzindo a frequência de ataques e de comportamentos preditivos de ansiedade. O presente trabalho evidencia efeitos prejudiciais no comportamento de peixes mesmo quando expostos a baixas concentrações do fármaco Diazepam.

Palavras-chave: Ecotoxicologia aquática. Medicamentos psiquiátricos. Toxicidade. Zebrafish.

1. Introdução

O desenvolvimento tecnológico e o crescimento populacional têm contribuído para o aumento da produção e consumo mundial de fármacos em todo o mundo (Fent, Weston, Caminada, 2006). Existem mais de 5.000 substâncias comercializadas como medicamentos (Knox et al., 2011), as quais podem ser excretadas como metabólitos ou compostos ativos e lançados em diferentes ambientes, principalmente nos ambientes aquáticos, podendo ser contaminantes ambientais (Calisto, Esteves, 2009).

Uma vez que os fármacos são construídos para permanecerem biologicamente ativos, muitos deles resistem à degradação biológica, à fotodegradação e apresentam potencial de afetar espécies não alvos (Cardoso, Porcher, Sanchez, 2014, Brandão et al., 2013). Evidências indicam que organismos não alvos dos fármacos podem ser cronicamente expostos a baixas concentrações de uma variedade de substâncias, com significantes efeitos biológicos e riscos ambientais pouco conhecidos (Sanderson et al., 2003, Cardoso, Porcher, Sanchez, 2014).

Os resíduos farmacêuticos encontrados nos ecossistemas aquáticos pertencem a várias classes, como hormônios, antibióticos, anti-inflamatórios, antipiréticos, redutores de lipídeos, anticonvulsivos, antidepressivos e ansiolíticos (Calisto, Esteves, 2009). Entre esses compostos, os fármacos psiquiátricos compõem um grupo de substâncias comumente prescritas em todo o mundo (Fent, Weston, Caminada, 2006), pertencentes aos grupos de antiepiléticos, como carbamazepine, aos antidepressivos, como a fluoxetina e aos tranquilizantes, como o diazepam (Fabbri, 2015, Heberer, 2002). O consumo de medicamentos psiquiátricos apresenta acentuado crescimento mundial (IMS Health, 2006, IMS Health Canada, 2004).

Entre as fármacos psiquiátricas mais consumidas está o diazepam (Baker et al., 2014), que é um benzodiazepínico de uso terapêutico humano e veterinário, prescrito como ansiolítico, sedativo, relaxante muscular, anticonvulsivo e antiepilético, que age nos receptores do tipo

GABA, potencializando o efeito inibitório do neurotransmissor (Brandão et al., 2013), esse fármaco foi encontrado na Alemanha na concentração de 0,88 µg/L (Ternes et al., 2001) e no Brasil na concentração de 0,763 µg/L (Böger et al., 2018). Os fármacos psiquiátricos têm sido detectados no meio ambiente, em efluentes domésticos, em rios e na água utilizada para abastecimento humano em diferentes partes do mundo (Wu et al., 2015, Van der Vem et al., 2006, Ternes, Bonerz, Schmidt, 2001, Kolpin et al., 2002, Yuan et al., 2013, Snyder, 2008).

Em função da conservação evolutiva de receptores farmacológicos (receptores e biomoléculas) nos diferentes grupos de seres vivos, os fármacos psiquiátricos podem apresentar efeitos toxicológicos, os quais já foram constatados em estudos com diversos organismos (Brooks et al., 2003, Van der Vem et al., 2006, Crane, Watts, Boucard, 2006). Entretanto, os efeitos dessas substâncias em organismos aquáticos não alvos são superficialmente conhecidos (Brodin et al., 2014).

Entre os organismos aquáticos os peixes constituem a classe mais diversa dos vertebrados, que ocorre em variados habitats e com alta susceptibilidade fisiológica à contaminação por fármacos psiquiátricos (Brown et al., 2014). Essas características revelam o alto potencial para uso de peixes como modelo para a avaliação de riscos ambientais causados por fármacos (Bolis et al., 2001, Margiotta-Casaluci et al., 2014). Entre os efeitos adversos em peixes causados por fármacos psiquiátricos estão as alterações comportamentais. A constatação de alterações comportamentais em peixes indica efeitos no sistema nervoso dos animais, podendo impactar diretamente na sobrevivência e reprodução dos organismos (Scott, Sloman, 2004, Brodin et al., 2013, Brodin et al., 2014). Uma vez que os fármacos se encontram em concentrações baixas e subletais nos ambientes, eles têm sido negligenciados como fonte causadora de alteração de comportamento em organismos em sistemas naturais (Montiglio, Royauté, 2014). Contudo, em diferentes espécies de peixes há evidências de que os fármacos psiquiátricos podem causar efeitos comportamentais relacionadas à alimentação (Mennigen et

al., 2010), locomoção (Brandão et al., 2013, Kohlert et al., 2012, Brodin et al., 2014), agressividade (Dziewieczynski, Hebert, 2012), ansiedade (Richendrfer et al., 2012) e resposta ao estresse (Abreu et al., 2014). De acordo com Brodin et al. (2014), alterações em comportamentos de corte, agressividade, locomoção, resposta a predador, alimentação podem levar à morte de indivíduos e ter efeitos ecológicos importantes nas populações e no ecossistema aquático.

Assim, o presente estudo tem por objetivo avaliar os efeitos comportamentais de baixas concentrações de Diazepam em paulistinhas (*Danio rerio*).

2. Material e Métodos

2.1. Local de estudo

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Zoologia do Instituto Federal Goiano – Campus Urutaí.

2.2. Animal de estudo

Utilizamos 54 exemplares de paulistinhas (*Danio rerio*) adultos não sexados que foram adquiridos de criadouros comerciais em Goiânia - GO. Os peixes foram aclimatados em laboratório por um período de 30 dias, mantidos em grupos de até no máximo 20 indivíduos por aquário, cada aquário comportava 40L (30 cm de comprimento x 50 cm de largura x 45 cm de altura) que foi preenchido com água desclorada. O fotoperíodo foi mantido em ciclos de 14h claro/10h escuro (Gebauer et al., 2011) e a alimentação foi oferecida três vezes ao dia com ração comercial (Poytara Tropicais Flocos) específica para a espécie. A qualidade da água foi monitorada durante a aclimação e período experimental, mantendo-a adequada para o bem

estar dos peixes e a condução dos experimentos. Os parâmetros físico-químicos da água foram monitorados a cada três dias, tanto na aclimação quanto durante a execução do projeto, verificando a temperatura, o pH, a amônia e o oxigênio total e todos os parâmetros foram mantidos dentro dos valores recomendados para a espécie (Abreu et al., 2016; Fontana et al., 2018). A amônia foi quantificada por um kit comercial (Amônia Tóxica - LabconTeste); o pH por kit comercial (Teste de pH água doce - Mydor); o oxigênio dissolvido foi medido pelo kit comercial (O2 Dissolvido - LabconTeste) e a temperatura foi medida por um termômetro digital (Digital Thermometer).

2.3. Procedimento experimental

Os peixes foram separados em grupos compostos por seis indivíduos, cada grupo foi alojado em um aquário de 40L (30 cm de comprimento x 50 cm de largura 45 cm de altura) durante o período de exposição. Revestimos o fundo e as laterais dos aquários com plástico azul para evitar possível aversão dos peixes ao ambiente (Park et al., 2016).

O delineamento experimental consistiu na formação de 3 grupos experimentais, com duas concentrações diferentes de diazepam e de um grupo controle, para avaliar os efeitos dessas substâncias no comportamento do peixe. Cada grupo experimental teve n=18 e foi constituído por: Grupo Controle (C): sem adição de diazepam, apenas o solvente (dimetilsulfóxido – DMSO) utilizado para diluição; grupo Diazepam 1 (D1): adição de diazepam na concentração encontrada em ambientes aquáticos: 0,88 µg/L (Ternes, Bonerz, Schmidt, 2001), essa concentração foi utilizada com o intuito de simular o que está acontecendo na natureza e grupo Diazepam 2 (D2): adição de diazepam na concentração 10 vezes superior à encontrada em ambientes aquáticos: 8,8 µg/L, essa concentração foi utilizada prevendo possível aumento do uso do fármaco devido ao crescimento populacional.

A exposição teve duração de 5 dias (120h), todos os peixes foram aclimatados por um período de 24h para se acostumarem às condições do experimento. Após este período o fármaco foi administrado nos respectivos grupos. Os testes comportamentais foram realizados em 0h, determinado como pré-tratamento, 24h, 48h, 72h e 120h de exposição ao diazepam, considerado como período de tratamento.

2.4. Concentração e administração do fármaco

Utilizamos como fármaco o diazepam, que foi adquirido na forma de pó (pureza \geq 99,9%; CAS 439-14-5; PHARMANOSTRA). Para a diluição do diazepam utilizamos o solvente dimetilsulfóxido (DMSO) (pureza \geq 99,9%; CAS 67-68-5; DINÂMICA) na concentração final de 0,01% vol/vol. De acordo com Xiong et al. (2017), o DMSO nesta concentração não é suficiente para promover efeitos comportamentais em *Gobiocypris rarus* e *Danio rerio* em exposição aguda. No grupo controle não foi administrado o fármaco, foi administrado apenas o DMSO na mesma concentração que foi utilizado para dissolver o diazepam nos grupos tratamento. No grupo D1 foi administrado diazepam na concentração encontrada em ambientes aquáticos: 0,88 μ g/L (Ternes, Bonerz, Schmidt, 2001) no grupo D2 foi administrado diazepam na concentração 10 vezes superior à encontrada em ambientes aquáticos: 8,8 μ g/L. A exposição foi estática, com apenas uma única administração do fármaco de forma contínua durante todo o experimento, sendo assim, não houve renovação da água dos aquários no período experimental e devemos levar em consideração que as concentrações do fármaco se referem à quantidade de substância presente na água e não à quantidade biodisponível para o organismo.

2.5. Avaliação dos parâmetros comportamentais

Para avaliar os parâmetros comportamentais utilizamos os testes de espelho conforme sugerido por Holmberg et al. (2011) e o teste de tanque novo como sugerido por Gebauer et al. (2011) onde analisamos os comportamentos preditivos de ansiedade e de agressividade. Para registrar os testes comportamentos utilizamos câmeras de segurança (HD, Intelbras®) e posteriormente os vídeos foram analisados.

2.5.1. Ansiedade

Utilizamos o teste de tanque novo para analisar os comportamentos preditivos de ansiedade. Para isto, verificamos os parâmetros de latência para o primeiro cruzamento, tempo no topo e frequência de transição para o topo. Segundo Gebauer et al. (2011), o comportamento natural do peixe é permanecer no fundo do aparato como medida de proteção contra possíveis ameaças.

O teste de tanque novo foi realizado no período da manhã, o peixe era colocado individualmente no aparato e filmado por um período de seis minutos. O aparato utilizado para realizar o teste de tanque novo tem formato trapezoidal com 23,9 cm de comprimento no fundo x 28,9 cm de comprimento no topo x 7,4 cm de largura no topo x 6 cm de largura no fundo x 15,9 cm de altura.

2.5.2. Agressividade

Utilizamos o teste de espelho para analisar os comportamentos de agressividade, onde verificamos os parâmetros de latência para o primeiro ataque e frequência de ataques. Segundo

Theodoridi et al. (2017) comportamentos de ataque ao espelho são considerados preditivos de agressividade que pode interferir diretamente na sobrevivência dos peixes.

O teste de agressividade foi realizado no período da tarde onde os peixes eram colocados individualmente no aparato e filmados por um período de cinco minutos. O aparato utilizado para o teste de agressividade consiste em um aquário de vidro de 20 cm de comprimento x 15 cm de largura x 20 cm de altura, o qual foi acoplado um espelho em sua lateral esquerda em um ângulo de 90°.

3. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas no software livre BioEstat (Ayres & Junior Ayres, 2000). Os valores outliers (média \pm 2x desvio padrão) foram retirados e substituídos pela média uma única vez considerando (Leys et al., 2013). A normalidade residual dos dados foi verificada utilizando o teste de Shapiro-Wilk. Para comparar o grupo controle e os grupos diazepam em cada período da exposição aguda: 0h, 24h, 72h e 120h, os dados paramétricos foram submetidos à one-way ANOVA e pós-teste LSD e os dados não paramétricos submetidos ao Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn. O nível de significância para todas as análises foi de 5%.

4. Resultados

4.1. Agressividade

Os resultados da análise dos dados do teste do espelho sobre a agressividade estão dispostos na Figura 1. Em relação à agressividade, no parâmetro latência para o primeiro ataque

não houve efeito do fármaco [Kruskal-Wallis, 0h: $H_{2,48}=3,96$, $p=0,13$; 24h: $H_{2,48}=5,33$, $p=0,06$; 72h: $H_{2,48}=1,59$, $p=0,45$; 120h: $H_{2,48}=2,76$, $p=0,25$] (Figura 1A)

Para a frequência de ataques houve efeito do fármaco (Figura 1B), com redução de ataques nos grupos D1 e D2 em 24 e 72h de exposição, indicando efeito ansiolítico [Kruskal-Wallis, 0h: $H_{2,48}=2,24$, $p=0,32$; {ANOVA 24h: pós-teste de Tukey $p\leq 0,05$; 72h: pós-teste de Tukey $p\leq 0,05$; 120h: $F_{2,48}=0,24$, $p=0,78$ }].

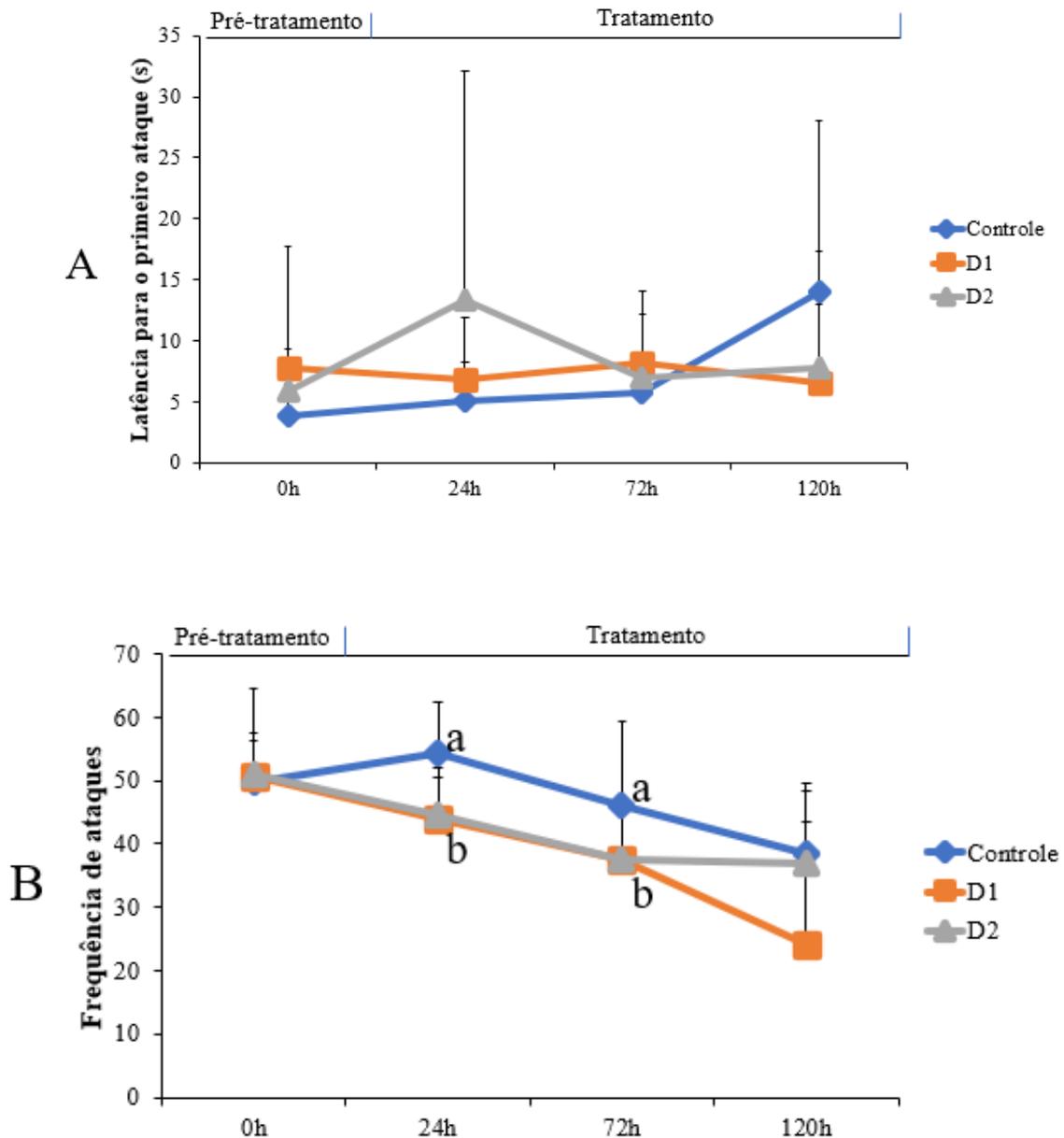


Figura 2. Comportamento de agressividade em *Danio rerio* comparado em 0h, 24h, 72h e 120h de exposição no teste de espelho durante 5 minutos nos grupos experimentais: Controle

(sem diazepam), D1 (0,88 µg/L de diazepam) e D2 (8,8 µg/L de diazepam). (A) Latência para o primeiro ataque. (B) Frequência de ataques. Kruskal-Wallis com pós-teste Tukey. Letras diferentes indicam diferença estatística entre grupos experimentais em cada período (n=18).

4.2. Ansiedade

Os resultados das análises dos dados do teste de tanque novo sobre os comportamentos preditivos de ansiedade estão dispostos na Figura 2. Em relação à latência para o primeiro cruzamento, o grupo D1 apresentou redução da latência em 120h, indicando efeito ansiolítico [Kruskal-Wallis, 0h: $H_{2,48}=0,44$, $p=0,80$; 24h: $H_{2,48}=2,70$, $p=0,25$; 72h: $H_{2,48}=2,42$, $p=0,29$; 120h: pós-teste de Dunn $p\leq 0,05$] (Figura 2A)

Em relação ao parâmetro tempo no topo, houve efeito ansiolítico do fármaco com aumento do tempo no topo a partir de 24h, no grupo D1 e 72h no grupo D2 [Kruskal-Wallis, 0h: $H_{2,48}=5,62$, $p=0,05$; 24h: pós-teste de Dunn $p\leq 0,05$; 72h: pós-teste de Dunn $p\leq 0,05$; {ANOVA 120h: pós-teste de Tukey $p\leq 0,05$ }] (Figura 2B).

A análise da frequência de cruzamentos também indicou efeito ansiolítico do fármaco, com diferenças estatísticas em 72 e 120h [Kruskal-Wallis, 0h: $H_{2,48}=5,76$, $p=0,06$; {ANOVA 24h: $F_{2,48}=3,05$, $p=0,05$; 72h: pós-teste de Tukey $p\leq 0,05$; 120h: pós-teste de Tukey $p\leq 0,05$ }] (Figura 2C).

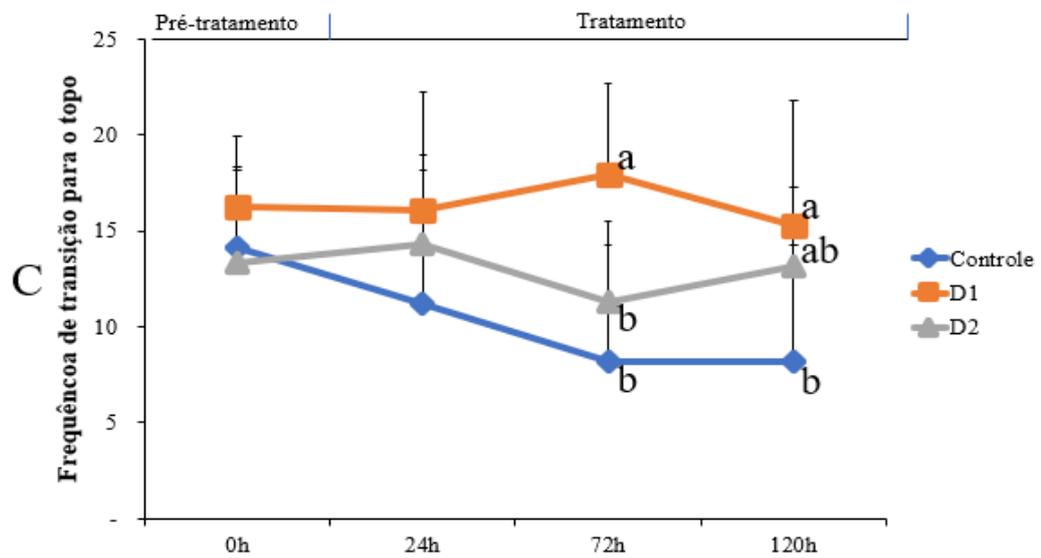
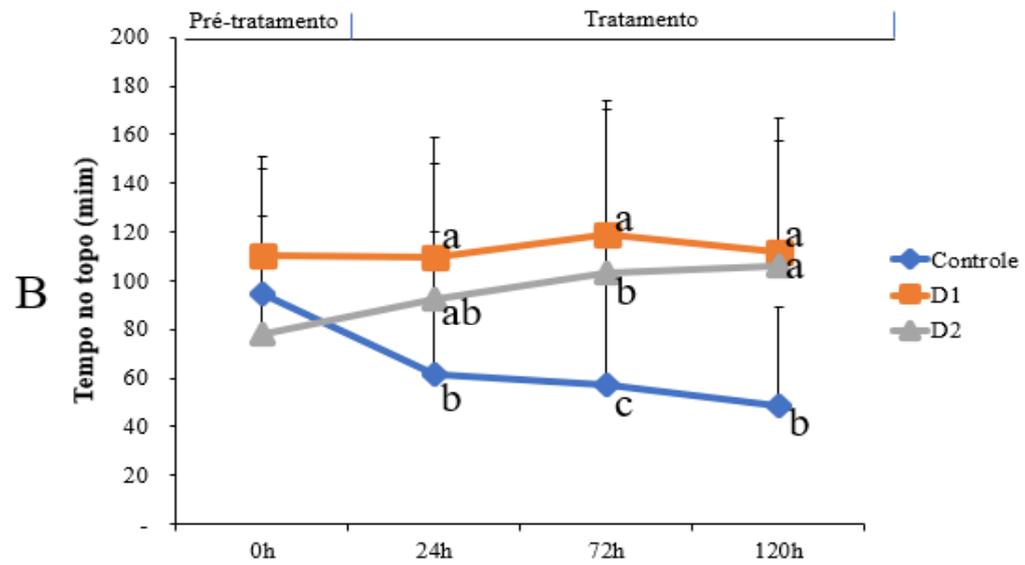
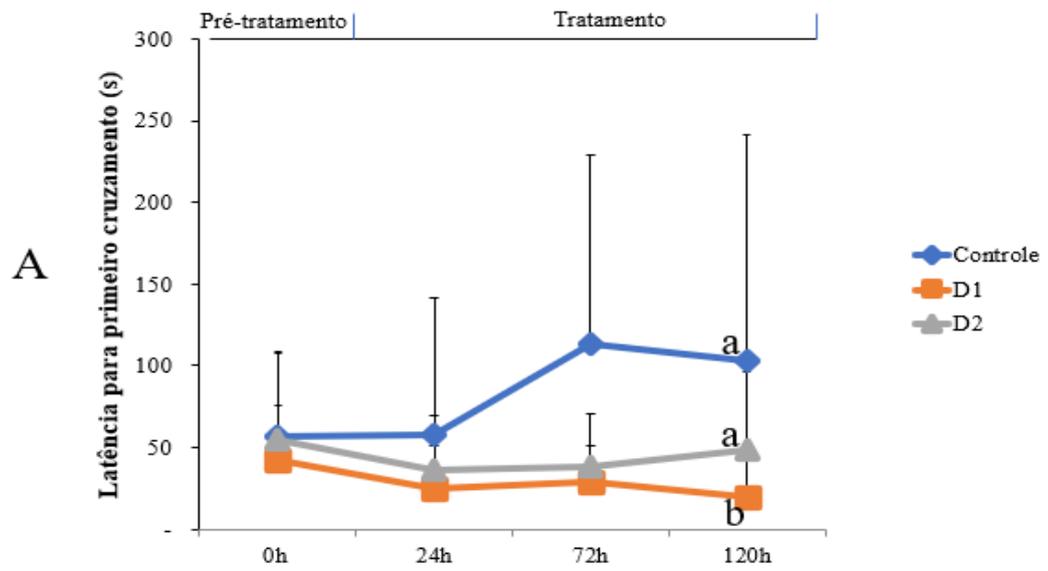


Figura 2. Comportamentos preditivos de ansiedade em *Danio rerio* comparado em 0h, 24h, 72h e 120h de exposição no teste de tanque novo durante 6 minutos nos grupos experimentais: Controle (sem diazepam), D1 (0,88 µg/L de diazepam) e D2 (8,8 µg/L de diazepam). (A) Latência para o primeiro cruzamento. (B) Tempo no topo. (C) Frequência de cruzamentos. Kruskal-Wallis com pós-teste Tukey. Letras diferentes indicam diferença estatística entre grupos experimentais em cada período (n=18).

5. Discussão

Nosso trabalho evidencia que a exposição em curto prazo ao diazepam em concentração ambiental (0,88 µg/L) e em concentração 10 vezes superior (8,8 µg/L) reduz a frequência de ataques em *Danio rerio*, indicando efeito ansiolítico do fármaco. Giacomini et al. (2016) em seus estudos mostram que a fluoxetina e o diazepam em exposição aguda bloqueiam respostas ao estresse no peixe paulistinha (*Danio rerio*), que por consequência reduz a agressividade e as interações sociais, corroborando os efeitos ansiolíticos do fármaco.

Existem vários estudos que mostram que o comportamento de agressividade é de suma importância para sobrevivência dos peixes, pois alterações nestes comportamentos pode alterar o fitness do organismo. Conforme Kohlert et al. (2012), o comportamento de agressividade dos peixes interfere diretamente em sua sobrevivência, seja em relação à reprodução, estabelecimento de hierarquias de dominância e até mesmo estabelecimento de território para acesso direto a recursos essenciais para a sobrevivência da espécie. Sendo assim, é plausível supor que a diminuição da agressividade encontrada em nosso trabalho possa afetar diretamente a viabilidade de peixes e outros organismos aquáticos em ambientes silvestres.

Além disto, nosso trabalho evidencia que o diazepam, mesmo em concentrações ambientais, causa efeito ansiolítico no comportamento de *Danio rerio*. Richendrfer et al.

(2012), em seus estudos verificaram que 0,05 mg/L de diazepam reduz o comportamento de tigmotaxia das larvas de *Danio rerio* em 2h de exposição. Steenbergen et al. (2011) também encontraram efeito ansiolítico expondo juvenis de *Danio rerio* por sete minutos na concentração de 750 µg/L de diazepam.

Vale ressaltar que existem vários estudos que comprovam efeitos ansiolíticos do diazepam em paulistinhas (Giacomini et al., 2016, Richendrfer et al., 2012, Steenbergen et al., 2011), porém, estes trabalhos usam larvas do peixe ou concentrações elevadas de fármacos em seus estudos, as larvas são mais sensíveis a exposição, todavia, nosso trabalho é o primeiro que evidencia efeitos comportamentais causados por concentração ambiental de diazepam em *Danio rerio*.

6. Conclusão

Nosso trabalho evidencia que a exposição a curto prazo ao diazepam em concentração ambiental (0,88 µg/L) e em concentração 10 vezes superior (8,8 µg/L) causam alterações no comportamento em adultos de *Danio rerio*, indicando efeito ansiolítico, evidenciado pela redução da agressividade e de comportamentos preditivos de ansiedade.

As alterações nos comportamentos evidenciadas em nosso trabalho, causada pelo diazepam em concentração ambiental, é motivo de preocupação, visto que as estações de tratamento de água e esgoto são ineficientes para a remoção dos fármacos dessas águas tratadas. Essas alterações afetam diretamente o funcionamento social e ecológico das espécies, afetando a sobrevivência e perpetuação destes organismos, sendo assim, causando impactos ecologicamente relevantes podendo afetar até mesmo as cadeias tróficas. No entanto, vemos a importância de exposições crônicas envolvendo avaliações de biodisponibilidade, avaliações morfológicas e fisiológicas e também avaliações de transferência geracional para a melhor

compreensão dos efeitos do diazepam e outros fármacos utilizados mundialmente, que são encontrados em ambientes aquáticos e as possíveis alterações que podem causar não somente nas espécies aquáticas, mas também em espécies que usam estes recursos, incluindo a espécie humana.

7. Referências

- ABREU, M. S. et al. The smell of “anxiety”: Behavioral modulation by experimental anosmia in zebrafish. **Physiology and Behavior**, 157, 67–71, 2016.
- ABREU, M. S. et al Diazepam and fluoxetine decrease the stress response in zebrafish. **Plos One**, 9(7): 1-5, 2014.
- AYRES, M.; JUNIOR AYRES, M. BioEstat 2.0: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. **BioEstat 2.0: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas**, 2000.
- BAKER, D. R. et al Ilicit and pharmaceutical drug consumption estimated via wastewater analysis. Part A: Chemical analysis and drug use estimates. **Science of the Total Environment**, 487: 629-641, 2014.
- BÖGER, B. et al. Determination of carbamazepine and diazepam by SPE-HPLC-DAD in Belém River water, Curitiba-PR/Brazil. **Revista Ambiente & Água**, 13(2), 2018.
- BOLIS, C. L. Fish as model in pharmacological and biological research. **Pharmacological Research**, 44(4): 265-268, 2001.
- BRANDÃO, F. P. et al. Short-term effect of neuroactive pharmaceutical drugs on a fish species: biochemical and behavioural effects. **Aquatic Toxicology**, 144-145: 218-229, 2013.
- BRODIN, T. et al. Dilute concentrations of a psychiatric drug alter behavior of fish from natural populations. **Science**, 339: 814-815, 2013.
- BRODIN, T. et al. Ecological effects of pharmaceuticals in aquatic systems – impacts through behavioural alterations. **Philosophical Transactions of The Royal Society B**, 369: 1-10, 2014.
- BROOKS, B. W. et al. Aquatic ecotoxicology of fluoxetine. **Toxicology Letters**, 142: 169-183, 2003.
- BROWN, A. R. et al Assessing variation in the potential susceptibility of fish to pharmaceuticals, considering evolutionary differences in their physiology and ecology. **Philosophical Transactions of The Royal Society B**. 369: 1-11, 2014.
- CALISTO, V, ESTEVES, V. I. Psychiatric pharmaceuticals in the environment. **Chemosphere**, 77: 1257-1274, 2009.

- CARDOSO, O, PORCHER, J, SANCHEZ, W. Factory-discharged pharmaceuticals could be a relevant source of aquatic environment contamination: review of evidence and need for knowledge. **Chemosphere**, 115: 20-30, 2014.
- CRANE, M, WATTS, C, BOUCARD, T. Chronic aquatic environmental risks from exposure to human pharmaceuticals. **Science of Total Environment**, 367: 23-41, 2006.
- DZIEWECZYNSKI, T. L, HEBERT, O. Fluoxetine alters behavioral consistency of aggression and courtship in male Siamese fighting fish, *Betta splendens*. **Physiology & Behavior**, 107: 92-97, 2012.
- FABBRI, E. Pharmaceuticals in the environment: expected and unexpected effects on aquatic fauna. **Annual New York Academic of Sciences**, 1340: 20-28, 2014.
- FENT, K, WESTON, A. A, CAMINADA. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. **Aquatic Toxicology**, 76: 122-159, 2006.
- FONTANA, B. D. et al. Taurine modulates acute ethanol-induced social behavioral deficits and fear responses in adult zebrafish. **Journal of Psychiatric Research**, 104, n. August, 176– 182, 2018.
- GEBAUER, D. L. et al. Effects of anxiolytics in zebrafish: similarities and differences between benzodiazepines, buspirone and ethanol. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, 99: 480-486, 2011.
- GIACOMINI, A.C.V.V. et al. Fluoxetine and diazepam acutely modulate stress induced behavior. **Behavioural Brain Research**, 296, 301-310, 2016.
- HEBERER, T. Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. **Toxicology Letters**, 131: 5-17, 2002.
- HOLMBERG, A. et al. Does waterborne citalopram affect the aggressive and sexual behavior of rainbow trout and guppy? **Journal of Hazardous Materials**, 187: 596-599, 2011.
- IMS HEALTH CANADA. In Canada, depression ranks as fast growing diagnosis. IMS Health, Inc, 2004.
- IMS HEALTH. Commonly Requested Therapeutic Class and Product Information. IMS Health, Inc, 2006.
- KNOX, C. et al. DrugBank 3.0: a comprehensive resource for 'Omics' research on drugs. **Nucleic Acids Research**, 39(1), 1035-1041, 2011.
- KOHLERT, J. G. et al. Decreased aggressive and locomotor behaviors in *Betta splendens* after exposure to fluoxetine. **Psychological Reports**, 110(1): 51-62, 2012.
- KOLPIN, D. W. et al. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in US streams, 1999-2000: a national reconnaissance. **Environmental Science and Technology**, 36: 1202-1211, 2002.
- LEYS, C. et al. Detecting outliers: Do not use standard deviation around the mean, use absolute deviation around the median. **Journal of Experimental Social Psychology**, 49(4), 764- 766, 2013.

MARGIOTTA-CASALUCI, L et al. Quantitative cross-species extrapolation between humans and fish: the case of the anti-depressant fluoxetine. *Plos One*, 9(10): 1-19, 2014.

MENNIGEN, J. A. et al Waterborne fluoxetine disrupts feeding and energy metabolism in the goldfish *Carassius auratus*. ***Aquatic Toxicology***, 100: 128-137, 2010.

MONTIGLIO, P. O, ROYAUTÉ, R. Contaminants as a neglected source of behavioural variation. ***Animal Behaviour***, 88: 29-35, 2014.

PARK, J. S. et al. Innate color preference of zebrafish and its use in behavioral analyses. ***Molecules and Cells***, 39, n. 10, 750–755, 1 out. 2016.

RICHENDRER, H. et al On the edge: pharmacological evidence for anxiety-related behavior in zebrafish larvae. ***Behavioural Brain Research***, 228: 99-106, 2012.

SANDERSON, H. et al Probabilistic hazard assessment of environmentally occurring pharmaceuticals toxicity to fish, daphnids and algae by ECOSAR screening. ***Toxicology Letters***, 144: 383-395, 2003.

SCOTT, G. R, SLOMAN, K. A. The effects of environmental pollutants on complex fish behavior: integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. ***Aquatic Toxicology***, 68: 369-392, 2004.

STEENBERGEN, P.J. et al. Patterns of avoidance behaviours in the light/dark preference test in young juvenile zebrafish: a pharmacological study. ***Behavioural Brain Research***, 222(1), 15-25, 2011.

SNYDER, S. A. Occurrence, treatment and toxicological relevance of EDCs and pharmaceuticals in water. ***Ozone Science and Engineering***, 30: 65-69, 2009.

TERNES, T, BONERZ, M, SCHMIDT, T. Determination of neutral pharmaceuticals in wastewater and rivers by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. ***Journal of Chromatography, A*** 938: 175- 185, 2001.

THEODORIDI, A, TSALAFOUTA, A, PAVLIDIS, M. Acute Exposure to Fluoxetine Alters Aggressive Behavior of Zebrafish and Expression of Genes Involved in Serotonergic System Regulation. ***Frontiers in Neuroscience***, 11, n. April, 1–9, 2017.

VAN DER VEN, K. et al Neuropharmaceuticals in the environment: mianserin-induced neuroendocrine disruption in zebrafish (*Danio rerio*) using cDNA microarrays. ***Environmental Toxicology and Chemistry***, 25: 2645- 2652, 2006.

WU, M. et al. Occurrence and fate of psychiatric pharmaceuticals in the urban water system of Shanghai, China. ***Chemosphere***, 138: 486-493, 2015.

XIONG, X. et al. Comparative developmental toxicity and stress protein responses of dimethyl sulfoxide to rare minnow and zebrafish embryos/larvae. ***Zebrafish***, 14(1), 60-68, 2017.

YUAN, S. I. et al Detection, occurrence and fate of 22 psychiatric pharmaceuticals in psychiatric hospital and municipal wastewater treatment plants in Beijing, China. ***Chemosphere***, 90: 2520-2525, 2013.