

JOYCE MOREIRA DE SOUZA

**EXPOSIÇÃO À ÁGUA CONTENDO “MIX” DE POLUENTES
ALTERA A RESPOSTA ANTIPREDATÓRIA DE CAMUNDONGOS**

C57BL/6J

**Programa de Pós-Graduação em Conservação de Recursos Naturais do Cerrado
(Mestrado Profissional)**

**Urutaí (GO)
2018**





Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano

Reitor

Prof. Dr. Vicente Pereira Almeida

Pró-Reitor de Pesquisa e Pós-Graduação e Inovação

Prof. Dr. Fabiano Guimarães Silva

Campus Urutaí

Diretor Geral

Prof. Dr. Gilson Dourado da Silva

Diretor de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação

Prof. Dr. André Luís da Silva Castro

Programa de Pós-Graduação em Conservação de Recursos Naturais do Cerrado

Coordenador

Prof. Dr. Ivandilson Pessoa Pinto de Menezes

JOYCE MOREIRA DE SOUZA

**EXPOSIÇÃO À ÁGUA CONTENDO “MIX” DE POLUENTES
ALTERA A RESPOSTA ANTIPREDATÓRIA DE
CAMUNDONGOS C57BL/6J**

Orientador

Prof. Dr. **Guilherme Malafaia**

Coorientador

Prof. Dr. **Thiago Lopes Rocha**

Dissertação apresentada ao Instituto Federal Goiano –
Campus Urutaí, como parte das exigências do Programa
de Pós-Graduação em Conservação de Recursos Naturais
do Cerrado para obtenção do título de Mestre.

Urutaí, GO

2018

Os direitos de tradução e reprodução reservados.

Nenhuma parte desta publicação poderá ser gravada, armazenada em sistemas eletrônicos, fotocopiada ou reproduzida por meios mecânicos ou eletrônicos ou utilizada sem a observância das normas de direito autoral.

ISSN XX-XXX-XXX

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/IF Goiano Campus Urutaí

S725e Souza, Joyce Moreira de.

Exposição à água contendo "mix" de poluentes altera a resposta antipredatória de camundongos C57BL/6J / Campus Urutaí. [manuscrito] / Joyce Moreira de Souza. -- Urutaí, GO: IF Goiano, 2018. 82 fls.

Orientador: Dr. Guilherme Malafaia

Dissertação (Mestrado) - Instituto Federal Goiano - Campus Urutaí, 2018.

1. Comportamento defensivo. 2. Predador.
3. Mix de poluentes. 4. Poluição aquática. I. Título.


CDU 57




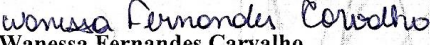
FICHA DE APROVAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

| | |
|------------------------|---|
| Título da dissertação: | Exposição à água contendo "mix" de poluentes altera a resposta antipredatória de camundongos C57BL/6J |
| Orientador: | Prof. Dr. Guilherme Malafaia |
| Coorientador: | Thiago Lopes Rocha |
| Autora: | Joyce Moreira de Souza |

Dissertação de Mestrado **APROVADA** em 28 de fevereiro de 2018, como parte das exigências para obtenção do Título de **MESTRA EM CONSERVAÇÃO DE RECURSOS NATURAIS DO CERRADO**, pela Banca Examinadora especificada a seguir:


Prof. Dr. Guilherme Malafaia
 Instituto Federal Goiano – Campus Urutaí
 Presidente


Prof. Dr. Ivandilson Pessoa Pinto de Menezes
 Instituto Federal Goiano – Campus Urutaí
 Membro titular


Prof.ª Dra. Wanessa Fernandes Carvalho
 Universidade Federal de Goiás – Campus Samambaia
 Membro titular

*“Tudo vale a pena se a alma não é
pequena”.*

Fernando Pessoa

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Papai do céu por me conceder sabedoria e por me abençoar ao longo dessa caminhada.

À minha amada mãezinha, Joana Moreira, meu porto seguro, a quem devo tudo que sou hoje. Obrigada por estar sempre ao meu lado me acolhendo em momentos de aflição, e por vibrar junto a mim nos momentos de glória e por me lembrar sempre que tudo na vida acontece por um propósito.

Ao meu amor Hudson Silva, por se dedicar a mim com tanto carinho, entendendo minhas ausências e acreditando no meu potencial, além de me apoiar em cada dificuldade, me elogiando e me abraçando em cada obstáculo vencido.

Ao meu querido orientador, Guilherme Malafaia, pela imensa oportunidade a mim concedida de fazer parte de sua equipe. Acompanhando-te ampliei meus conhecimentos muito além do que o mestrado poderia me proporcionar. A você mestre querido, agradeço imensamente pela paciência, dedicação e o mais valioso, a amizade. Obrigada pelo incentivo e motivação. Um exemplo de professor competente que levarei para toda vida.

Às minhas amigas Bruna Oliveira (mana) e Denise Braga. Bruna Oliveira, obrigada pelo companheirismo de todos os dias, de todos os experimentos e pela amizade que foi construída devagar com tropeços e acertos; hoje você é uma grande amiga. Denise Braga, obrigada pela amizade à primeira vista. A vocês o meu muito obrigada por estarem comigo em momentos angustiantes e felizes. Aprendi muito com vocês, além de ter me divertido muito com vocês.

Aos meus amigos do Laboratório de Pesquisas Biológicas, Letícia Martins, Thales Quintão, Raíssa Ferreira, Carlos Mesak, Mateus Montalvão, Wellington Mizael, Abraão Thiago, Letícia Cardoso e Fernanda Estrela pelo o companheirismo de todos os dias e por me auxiliarem nesse e em outros trabalhos.

Ao meu coorientador Thiago Lopes pelo apoio no presente trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Conservação dos Recursos Naturais do Cerrado, pelo conhecimento ofertado em suas disciplinas.

Ao Instituto Federal Goiano – Câmpus Urutaí, por proporcionar ensino de qualidade.

E por fim, agradeço à Fundo de Amparo a Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG) pela concessão da minha bolsa de estudos.

SUMÁRIO

| | |
|--|-------------|
| LISTA DE FIGURAS | ix |
| LISTA DE TABELAS..... | xi |
| RESUMO | xii |
| ABSTRACT | xiii |
| | |
| 1. INTRODUÇÃO | 01 |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS..... | 04 |
| 2.1. Animais e delineamento experimental | 04 |
| 2.2. Mistura de poluentes: componentes e caracterização química..... | 05 |
| 2.3. Testes comportamentais | 11 |
| 2.3.1. Teste do Campo Aberto..... | 11 |
| 2.3.2. Teste de locomoção induzido por fonte luminosa..... | 13 |
| 2.3.3. Teste Olfatório | 15 |
| 2.3.4. Teste Auditivo | 17 |
| 2.3.5. Teste Resposta ao Predador..... | 19 |
| 2.3.5.1 Teste Resposta ao Predador Felino | 20 |
| 2.3.5.2. Teste Resposta ao Predador Ofídico..... | 22 |
| 2.4. Biomassa corpórea e massa relativa de órgãos | 24 |
| 2.5. Bioacumulação de cromo e magnésio | 24 |
| 2.6. Análise estatísticas | 25 |
| 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 25 |
| 3.1. Caracterização química do mix de poluente..... | 25 |
| 3.2. Biometria..... | 29 |
| 3.3. Comportamentos dos animais..... | 32 |
| 4. CONCLUSÃO | 44 |
| 5. REFERÊNCIAS | 44 |
| ANEXOS | |

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** Distribuição temporal dos testes comportamentais os quais os camundongos C57Bl/6J foram submetidos após a exposição ou não a água contaminada por um mix de poluentes.....10
- Figura 2-** (A) Sala com isolamento acústico, na qual foram realizados os testes comportamentais e as três câmeras de vídeo e (B) computador localizado fora da sala, o qual é acoplado as câmeras de vídeo..... 11
- Figura 3-** (A) Imagem representativa da vista frontal externa (A) e interna (B) dos aparatos utilizados no teste do campo aberto. As cores e dimensões são meramente ilustrativas. (C) Aparato real utilizado no teste.....12
- Figura 4-** (A) Imagem representativa da vista geral da sala de teste com o aparato utilizado no teste de locomoção induzido por fonte luminosa (teste visual) e (B) detalhe do aparato utilizado, demonstrando as diferentes zonas (1, 2 e 3), utilizadas para aferir a atividade locomotora do animal. As cores e dimensões são meramente ilustrativas. (C) Aparato real utilizado no teste.....14
- Figura 5-** Imagem representativa da vista frontal interna dos aparatos utilizados no teste olfatório com destaque para a sessão do teste em que se utilizou papel filtro sem odor (A) e em que se utilizou papel filtro com odor (B) (óleo de citronela). As cores e dimensões são meramente ilustrativas. (C) Aparato real utilizado no teste.....16
- Figura 6-** (A) Imagem representativa da vista frontal externa do aparato utilizado no teste auditivo na sala de teste. (B) Imagem representativa da vista frontal interna do aparato do teste auditivo e dos animais durante a sessão com o som desligado e com o (C) som ligado na sala de teste. As cores e dimensões são meramente ilustrativa. Em “B” e “C” as setas estão ilustrando que as “paredes” das caixas foram retiradas para que o interior do aparato possa ser visualizado. (D) Aparato real utilizado no teste.....18
- Figura 7-** (A) Imagem ilustrando o comportamento de *freezing* (Fonte: Arquivo pessoal) e (B) imagem ilustrando o comportamento de *self-grooming* (Fonte: Henrique-Alves & Queiroz (2016))19
- Figura 8-** Imagem representativa da vista frontal interna dos aparatos utilizados na (A) sessão sem estímulo predatório e (B) na sessão com estímulo predatório do teste de resposta ao predador felino na sala de teste. As cores são meramente ilustrativas. (C) Aparato real utilizado no teste.....20
- Figura 9-** Imagem representativa da vista frontal interna dos aparatos utilizados na (A) sessão sem estímulo predatório e (B) na sessão com estímulo predatório do teste de resposta ao predador ofídico na sala de teste. As cores e dimensões são meramente ilustrativas. (C) Aparato real utilizado no teste.....23
- Figura 10-** Espectros de massas para amostra referente ao tratamento do grupo Mix 25x obtido por meio da ESI (+) Orbitrap MS (A) e ESI (-) Orbitrap MS (B).....26
- Figura 11-** (A) Massa corpórea (g), (B) consumo médio diário de ração (g) e (C) consumo médio diário de água (mL) dos machos de camundongos da linhagem C57Bl/6J expostos ou não à água contaminada nas concentrações Mix 1x, Mix 10x e Mix 25x30

| | |
|--|----|
| Figura 12- (A) Massa relativa dos órgãos (Fígado, Cérebro, Rins e Baço), (B) massa corpórea ao longo do experimento dos machos de camundongos da linhagem C57Bl/6J expostos ou não à água contaminada nas concentrações Mix 1x, Mix 10x e Mix 25x. | 31 |
| Figura 13- (A) Imagem representativa do teste do campo aberto, (B) total de cruzamentos nos quadrantes do campo aberto, (C) locomoção no quadrante central/relação total da locomoção no teste do campo aberto e (D) obteve notas médias para a Escala de Basso Mouse para locomoção dos machos de camundongos da linhagem C57Bl/6J expostos ou não à água contaminada nas concentrações Mix 1x, Mix 10x e Mix 25x..... | 33 |
| Figura 14- (A) Imagem representativa do teste locomoção induzido por fonte luminosa (teste visual), (B) latência (s) para virar contra a fonte luminosa (teste visual), (C) imagem representativa do teste olfatório e (D) tempo (s) de exploração dos papeis com água e óleo de citronela dos machos de camundongos da linhagem C57Bl/6J expostos ou não à água contaminada nas concentrações Mix 1x, Mix 10x e Mix 25x..... | 34 |
| Figura 15- (A) Imagem representativa do teste auditivo, (B) total de cruzamentos na arena do aparato do teste auditivo, (C) Frequência de <i>freezing</i> e (D) Tempo (s) de <i>self-grooming</i> de machos de camundongos da linhagem C57Bl/6J expostos ou não à água contaminada nas concentrações Mix 1x, Mix 10x e Mix 25x..... | 36 |
| Figura 16- (A) Imagem representativa do teste de resposta ao predador felino, (B) tempo (s) de permanência na toca, (C) tempo (s) de <i>freezing</i> em relação ao tempo de permanência do animal fora da toca, e (D) tempo (s) de <i>self-grooming</i> em relação ao tempo de permanência do animal fora da toca de exploração dos machos de camundongos da linhagem C57Bl/6J expostos ou não à água contaminada nas concentrações Mix 1x, Mix 10x e Mix 25x. | 39 |
| Figura 17- Níveis de cromo (A) e magnésio (B) no sangue de machos de camundongos C57Bl/6J expostos ou não à ingestão crônica de água contendo um mix de poluentes nas concentrações Mix 1x, Mix 10x e Mix 25x..... | 40 |
| Figura 18- (A) Imagem representativa do teste de resposta ao predador ofídico, (B) Tempo de permanência na toca, (C) tempo de congelamento em relação ao tempo de permanência fora da toca, (D) tempo de <i>self-grooming</i> em relação ao tempo de permanência fora da toca dos machos de camundongos da linhagem C57Bl/6J expostos ou não à água contaminada nas concentrações Mix 1x, Mix 10x e Mix 25x..... | 43 |

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1-** Informações gerais dos poluentes utilizados na mistura no presente estudo.....07
- Tabela 2-** Caracterização físico-química e química da água potável e dos tratamentos contendo mix de micropoluentes em concentração ambiental (1x), em concentração 10 e 25 vezes superiores oferecidos a machos de camundongos C57Bl/6J.....26
- Tabela 3-** Fórmulas moleculares identificadas aos íons mais intensos detectados na amostra referente ao tratamento do grupo Mix 25x obtidas por meio da ESI(-) Orbitrap MS e ESI(+) Orbitrap MS. Todos os íons foram detectados como [H-H]-.....27

EXPOSIÇÃO À ÁGUA CONTENDO “MIX” DE POLUENTES ALTERA A RESPOSTA ANTIPREDATÓRIA DE CAMUNDONGOS C57BL/6J

RESUMO

Estudos prévios já confirmaram os efeitos tóxicos de distintos poluentes (isoladamente) sobre os mamíferos. Entretanto, os efeitos ocasionados pela exposição desses animais a misturas (mix) de poluentes ainda não foi avaliado. Logo, nosso estudo visou avaliar o efeito da exposição crônica (105 dias) de camundongos C57Bl/6J a um mix de poluentes, sobre a resposta a potenciais predadores. Para isso, foram estabelecidos grupos “controle”, “Mix 1x” (compostos de 14 poluentes identificados em águas superficiais, em concentrações ambientalmente relevantes), “Mix 10x” e “Mix 25x” (10 e 25 vezes maior que a Mix 1x). A partir do 93º dia experimental, os animais foram submetidos, sequencialmente, a testes que evidenciam alterações locomotoras, visuais, olfatórias e auditivas para avaliar alterações nessas habilidades, as quais são essenciais para a exibição de comportamento anti-predatório. Em seguida, foi avaliado o comportamento dos animais aos potenciais predadores (*Felis catus* e *Pantherophis guttatus*). Nossos dados demonstraram que não houve exibição de resposta defensiva de nenhum dos grupos experimentais ao estímulo predatório proporcionado por *P. guttatus*. No entanto, apenas os animais controle, exibiram comportamento anti-predatório quando *F. catus* foi introduzido no aparato, o que sugere déficit de resposta defensiva ocasionado pelos tratamentos. Assim, nosso estudo evidencia, pioneiramente, que a ingestão crônica de água contendo mix de poluentes (mesmo em baixas concentrações), causa distúrbio comportamental que, em nível ecológico, pode afetar a sobrevivência e a dinâmica populacional das espécies de mamíferos.

Palavras-chave: Comportamento defensivo; predador; mix de poluentes; poluição aquática.

EXPOSURE TO WATER CONTAINING "MIX" OF POLLUTANTS ALTERS THE ANTI-PREDATORY RESPONSE OF C57BL/6J

ABSTRACT

Previous studies have individually confirmed the toxic effects from different pollutants on mammals. However, effects resulting from the exposure of these animals to multi-pollutant mixes have not been studied so far. Thus, the aim of the current study is to assess the effect from the chronic exposure (105 days) of C57Bl/6J mice to a mix of pollutants on their response to potential predators. In order to do so, the following groups were formed: "control", "Mix 1x [compounds from 15 pollutants identified in surface waters at environmentally relevant concentration (ERC)]", "Mix 10x" and "Mix 25x" (concentrations 10 and 25 times higher than the ERC). From the 93th experimental day on, the animals were subjected to tests in order to investigate whether they showed locomotor, visual, olfactory and auditory changes, since these abilities are essential to their anti-predatory behavior. Next, the animals' behavior towards potential predators (*Felis catus* and *Pantherophis guttatus*) was assessed. The herein collected data did not show defensive response from any of the experimental groups to the predatory stimulus provided by *P. guttatus*. However, the control animals, only, presented anti-predatory behavior when *F. catus* was introduced in the apparatus, fact that suggests defensive response deficit resulting from the treatments. Thus, the current study is pioneer in showing that the chronic intake of water containing a mix of pollutants (even at low concentrations) leads to behavioral disorders able to affect the survival and population dynamics of mammalian species at ecological level.

Keywords: Defensive behavior; predator; mix of pollutants; water pollution.

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, devido ao crescimento exponencial da população humana, tem-se observado um incremento pela busca de recursos (i.e.: alimentos, manufaturas, vestuários, medicinais, etc.), assim como das atividades antropogênicas, as quais têm sido correlacionadas diretamente com a poluição dos sistemas fluviais (Lemos & Erdtmann, 2000; Emmersom et al., 2016; Quadra et al., 2016). Logo, a qualidade da água – um recurso natural indispensável para a sobrevivência das espécies (Soni et al., 2013) – vem se deteriorando e a sobrevivência dos organismos que nelas vivem, vem sendo colocada em risco.

Por sua vez, a sociedade consumista contemporânea, tem provocado um vertiginoso aumento da quantidade de resíduos (sólidos ou líquidos) gerada anualmente, que se descartados incorretamente no ambiente podem interferir negativamente nas comunidades e nos ecossistemas (Collares-Pereira & Cowx, 2004, Schwarzenbach et al., 2016). Isso se deve, especialmente, à presença de muitos poluentes na constituição dos resíduos que são descartados no ambiente natural (Deblonde et al., 2011), como por exemplo aqueles oriundos das atividades agrícolas (i.e.: herbicidas à base de glifosato), dos esgotos domésticos (i.e.: fármacos), de agroindústrias (i.e.: efluente de curtume), etc. Desse modo, a poluição aquática tem-se constituída um grande problema para os ecossistemas, afetando os animais que utilizam das fontes naturais de água, seja como habitat, seja para consumo e/ou reprodução (Paez-Osuna et al., 2017).

Um das atividades antropogênicas que tem provocado sérios impactos nos ambientes aquáticos referem-se às práticas agrícolas (Yadav et al., 2015). Para suprir a alta demanda por alimentos, as práticas e técnicas da agricultura convencional têm sido extensivamente utilizadas (Foley et al., 2011). No entanto, esse sistema de produção possui alto potencial poluidor dos recursos hídricos, devido, sobretudo, à utilização intensiva de distintos defensivos agrícolas.

Atualmente um dos fertilizantes mais utilizados em diferentes culturas, refere-se ao nitrogênio (Franklin et al., 2017), o qual é importante para a nutrição, desenvolvimento e produtividade das plantas (Kiba & Krapp, 2016; Leghari et al., 2016). Por outro lado, o uso de defensivos agrícolas tem crescido consideravelmente nos últimos anos (Rahman, 2013). Dentre os mais utilizados mundialmente, destacam-se o glifosato (Benbrook, 2016; Poiger et al., 2017) e a abamectina (Lasota & Dybas, 1990), defensivos agrícolas que devido às suas capacidades de agirem em organismos não-alvos podem ocasionar efeitos nocivos às plantas e aos animais (Costa & Nomura, 2016, Vasconcelos et al., 2017). Se por um lado esses agroquímicos contribuem enormemente para o aumento da produção e produtividade agrícola, por outro, a

perda do nitrogênio e a disseminação de defensivos agrícolas por escoamento ou lixiviação pode contaminar cursos d'água e provocar desequilíbrios nos ecossistemas (Weichert et al., 2017; Vasconcellos et al., 2017).

Outro problema que afeta negativamente os ecossistemas, refere-se ao despejo de efluentes agroindustriais nos corpos d'água, os quais são descartados, em muitas situações, de modo inadequado, ou seja, sem tratamento prévio ou após tratamento ineficaz (Gafny et al., 2000; Becker et al., 2008; Suthar et al., 2010). Um desses efluentes refere-se ao efluente de curtume (EC), produzido durante o beneficiamento de peles bovinas (para a confecção de couro), em indústrias curtumeiras que se concentram especialmente na América do Sul e em países asiáticos (Sabumon, 2016). Nestes países, tais indústrias apresentam grande importância para o setor econômico, pois o couro produzido é matéria prima destinada para distintos setores, tais como automobilístico, vestuário, calçadista, mobiliário, dentre outros (Hu et al., 2011; China e Ndaro, 2015; Sabumon, 2016). Contudo, essa atividade possui grande potencial para causar impactos ambientais devido, sobretudo, ao fato de que os efluentes produzidos nas etapas de processamento do couro apresentam variados compostos nocivos à saúde dos organismos, incluindo constituintes orgânicos e inorgânicos altamente tóxicos (e.g.: cromo, chumbo, arsênio, diftalato, bisfenol, dentre outros) (Guimarães et al., 2016; Estrela et al., 2017; Mendes et al., 2017).

Os esgotos domésticos também têm sido considerados causadores de problemas ambientais importantes, os quais estão ligados ao crescimento populacional (Noorhosseini et al., 2017). As altas cargas de esgotos lançados nos rios, córregos e/ou lagos podem conter diversos poluentes, incluindo detergentes (produto surfactante utilizado na limpeza doméstica), estrogênios (hormônios oriundos de pílulas anticoncepcionais), material orgânico, resíduos de medicamentos, etc. (Deblonde et al., 2011). Estudos mostram que os medicamentos, em especial, têm sido inseridos no ambiente principalmente através dos esgotos domésticos, em função do seu crescente uso (Pal et al., 2010), seja por meio da excreção, higienização das pessoas ou pelo seu descarte diretamente nas redes de esgotos (Daughton & Ruhoy, 2009).

Nesse contexto, estudos têm demonstrado diferentes impactos que estes poluentes podem acarretar em distintas classes de animais do subfilo Vertebrata (Craniata). Sobjak et al. (2017) e Novelli et al. (2016) investigaram sobre o efeito do glifosato e abamectina sobre peixes (*Rhamdia quelen* e *Danio rerio*), assim como Montalvão et al. (2017), Souza et al. (2017) e Mendes et al. (2017) que estudaram os efeitos da exposição de anfíbios (*Lithobates catesbeianus*), aves (*Melopsittacus undulatus*) e mamíferos (*Mus musculus*) à EC,

respectivamente. Além disso, Ghali et al. (2016) e Zhao et al. (2017) observaram efeitos do estrogênio em girinos (*Hyla arborea*) e peixes (*Danio rerio*). Outros estudos avaliaram os efeitos de distintos fármacos (e.g.: ibuprofeno, amoxicilina, clonazepam, fluoxetina, ácido acetilsalicílico, dentre outros) sobre peixes (*Lepomis gibbosus*) girinos (*Bufo arabicus*) e mamíferos (*Rattus norvegicus*) (Brandão et al., 2013; Barry et al., 2014; Veldhoen et al., 2014; Elizalde-Velázquez et al., 2017; Welham et al., 2017). Portanto, esses trabalhos demonstram que a contaminação aquática por estes poluentes pode trazer consequências drásticas para a biota, interferindo negativamente em aspectos essenciais ligados à sobrevivência e reprodução das espécies em diferentes níveis tróficos.

Embora essas pesquisas sejam importantes para identificar os efeitos nocivos nos vertebrados, eles podem não representar o que ocorre no ambiente. Nestes estudos, observa-se que seus delineamentos experimentais têm priorizado concentrações (ou doses de poluentes) muito superiores às observadas no ambiente natural, além de alguns as definirem com base em testes de toxicidade aguda [i.e.: concentrações letais médias (CL₅₀)], recomendados apenas para casos muito particulares. Além disso, a grande maioria desses trabalhos investigou o efeito dos poluentes na biota de maneira individual, diferentemente do que ocorre nos cursos d'água, que ao receberem descargas ou escoamento de poluentes, podem atuar como veiculadores de um mix de contaminantes.

A presença de misturas de poluentes no ambiente aquático tem sido corroborada por estudos prévios, os quais detectaram concentrações ambientais de representantes do grupo dos fármacos, agrotóxicos, surfactantes, bem como aqueles resíduos oriundos de setores petrolíferos e agroindustriais (Ternes, 1998; Perreault et al., 2003; Hoeger et al., 2005; Jardim et al., 2006; Flippin et al., 2007; Peruzzo et al., 2008; Ternes et al., 2011; Pamplona et al., 2011; Xu et al., 2014). Portanto, nota-se a necessidade de se avaliar os efeitos das misturas de poluentes (em concentrações ambientais) sobre os organismos que fazem o uso da água contaminada como habitat, para consumo e/ou reprodução. Conforme discutido por Wade et al. (2002), a exposição crônica à água contaminada por uma mistura de poluentes, pode influenciar direta ou indiretamente a sobrevivência das espécies e, conseqüentemente, a dinâmica populacional e ecológica dos ecossistemas.

Um campo ainda inexplorado refere-se aos possíveis efeitos que a ingestão de água contendo mix de poluentes pode causar sobre comportamentos típicos (inatos/aprendidos) de representantes da classe dos mamíferos. Comportamentos característicos desses animais, como por exemplo, suas performances frente a estímulos locomotores, visuais, olfatórios, auditivos,

bem como suas respostas defensivas a possíveis predadores, constituem estratégias essenciais que podem garantir sua sobrevivência e reprodução, assim como a perpetuação de sua espécie. Nesse sentido, o presente estudo objetivou avaliar o efeito da exposição crônica de camundongos machos da linhagem C57Bl/6J a uma mistura de poluentes comumente encontrados em águas superficiais sobre alguns de seus comportamentos, com foco, especialmente em suas respostas defensivas à potenciais predadores (felino e ofídico). Partimos da hipótese de que a ingestão de água contendo mix de poluentes pode causar distúrbios no sistema nervoso central dos animais que refletem anomalias comportamentais.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Animais e delineamento experimental

No presente estudo, foram utilizados camundongos machos da linhagem C57Bl/6J¹, com idade entre 21 e 32 dias, provenientes e mantidos no Biotério do Laboratório de Pesquisas Biológicas do Instituto Federal Goiano – Campus Urutaí (GO, Brasil) em condições sanitárias de biotério convencional, com temperatura (22 – 24°C), luminosidade (12 h de ciclo claro) controlada e umidade de 58 ± 3%. Foram alojados 11 animais por gaiola de polipropileno padrão para camundongos (41 cm de comprimento x 34 cm de largura x 16 cm de altura) com tampas gradeadas de arame galvanizado com tratamento antioxidante. A água (com ou sem tratamento) e ração padrão para roedores (Nuvilab CR1) foram ofertadas *ad libitum*. A água (com ou sem tratamento) foi trocada uma vez por semana.

Inicialmente 44 camundongos foram contrabalanceados de acordo com as co-variáveis “idade” e “biomassa”, de modo que as idades e as massas corpóreas foram estatisticamente iguais no início do experimento e, sequencialmente, os animais foram distribuídos nos seguintes grupos experimentais:

- 1) **Grupo controle** (n= 11), em que os animais receberam apenas água potável, sem qualquer tratamento;
- 2) **Grupo Mix 1x** (n= 11), em que os animais receberam água contendo mix de poluentes representantes da classe de resíduos farmacêuticos; hidrocarboneto; de resíduos agroindustriais; de hormônio sintético; de fertilizantes agrícolas, pesticidas e de resíduos surfactantes, em concentrações encontradas em águas superficiais (Tabela 1);

¹A fim de eliminar a variável genética, foram utilizados camundongos da linhagem C57Bl/6J a qual é isogênica, ou seja, contém o índice de homozigose > de 99%; logo, a variabilidade genética é bastante reduzida.

- 3) **Grupo Mix 10x** (n= 11), em que os animais receberam uma mistura de poluentes em concentrações 10 vezes superiores à definida no grupo anterior; e
- 4) **Grupo Mix 25x** (n= 11), ou seja, 25 vezes superiores à concentração definida no grupo Mix 1x.

O consumo de ração e água (com ou sem tratamento) foi estimado², por meio da subtração diária entre a cota oferecida e o rejeito do dia subsequente. Os animais foram expostos aos tratamentos por um período crônico de 105 dias, período que abrange a fase jovem e o início da fase adulta do animal (Flurkey et al., 2007). Nosso delineamento experimental visou simular uma exposição a baixas concentrações a certos contaminantes, especialmente, o grupo Mix 1x, o que pode representar, por exemplo, o lançamento contínuo de efluentes (domésticos e/ou industriais) tratados ou não nos corpos d'água ou o recebimento de lixiviados contaminados de agrotóxicos ou fertilizantes. Todos os procedimentos adotados neste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto Federal Goiano (IF Goiano) (GO, Brasil) (protocolo n. 6339041117).

2.2. Mistura de poluentes: componentes e caracterização química

O mix de poluentes que utilizamos foi preparado utilizando-se 15 poluentes comumente identificados em águas superficiais. Nosso intuito foi simular o que normalmente pode ser encontrado em cursos d'água, ou seja, um mix de poluentes, quando são descartados esgotos domésticos, industriais e agroindustriais nestes ambientes aquáticos, os quais podem servir de fonte de água a animais. No presente estudo, as concentrações utilizadas foram definidas com base em estudos prévios que identificaram cada um dos poluentes em águas superficiais, de rios em diferentes localidades (Tabela 1).

Os medicamentos representantes dos resíduos farmacêuticos foram selecionados de acordo com o alto e crescente consumo pela população humana (vide alguns estudos mencionados na Tabela 1) e devido à presença de resíduos desses medicamentos em esgotos domésticos e, conseqüentemente, em águas superficiais, identificados por estudos atuais (Quadra et al.; 2016; Chiavola et al., 2017; Zorpas et al., 2017). Por outro lado, o glifosato e a abamectina foram escolhidos como representantes dos defensivos agrícolas por serem

²O consumo de ração e água foi estimado devido o fato de que os animais (do mesmo grupo experimental) foram agrupados; logo, seria impossível saber qual foi consumo exato de cada camundongo. O agrupamento dos animais diminui o estresse dos mesmos por serem naturalmente sociais além de ser inviável alocar cada camundongo em uma caixa padrão, devido o número amostral utilizado no presente estudo.

pesticidas utilizados amplamente na agricultura convencional. Enquanto a abamectina pertence à família das avermectinas, a qual é produzida naturalmente pela fermentação de uma cultura de bactérias, *Streptomyces avermilitis* (Bai & Ogbourne, 2016); o glifosato é o herbicida mais utilizado mundialmente (Bai & Ogbourne, 2016).

O benzeno foi escolhido como representante dos hidrocarbonetos, uma vez que é um dos hidrocarbonetos aromáticos mais largamente utilizados como matéria-prima para diversos produtos, tais como detergentes, gasolina e plásticos (Barata-Silva et al., 2014). Já o nitrogênio e o detergente doméstico foram escolhidos como representantes da classe dos fertilizantes e surfactantes, respectivamente, uma vez que são aqueles mais utilizados na agricultura convencional (Lu & Tian, 2017) e na limpeza em geral, em residências domésticas (Scheibel, 2004), respectivamente.

Por outro lado, o estradiol foi escolhido como representante dos hormônios sintéticos, pois estudos prévios demonstram o aumento crescente deste hormônio pela população humana nos últimos anos (Louw-du Toit et al., 2017; Yang et al., 2017), em diferentes regiões do mundo. O EC, por sua vez, foi escolhido como representante da classe dos resíduos agroindustriais, pois se trata de um resíduo líquido altamente tóxico e de alta complexidade química produzido em grande quantidade por indústrias curtumeiras que processam a pele bovina. Tal resíduo normalmente é descartado em cursos d'água, ilegalmente, sem qualquer tratamento prévio, especialmente por indústrias curtumeiras rudimentares e de pequeno porte, espalhadas em países em desenvolvimento, localizados especialmente na Ásia e na América do Sul (Sabumon, 2016).

Todos os medicamentos (similarmente ao estudo de Abreu et al., 2016), estradiol, glifosato, nitrogênio, abamectina e detergente foram adquiridos em estabelecimentos comerciais comuns (vide marcas na Tabela 1). Ressalta-se que a abamectina foi aplicada na água ofertada aos animais a partir da formulação comercial Kraft[®] 36EC, classificado como acaricida, inseticida e nematicida (Tabela 1) (produto registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) do Brasil sob o nº 7703). A fonte de nitrogênio utilizada foi a ureia, pois esta é a mais utilizada na agricultura convencional. Já o EC utilizado foi obtido de uma indústria curtumeira localizada na cidade de Inhumas (Goiás, Brasil), tendo sido o mesmo utilizado recentemente por Souza et al. (2017).

Tabela 1. Informações gerais dos poluentes utilizados na mistura no presente estudo.

| Classe dos poluentes | Nome dos micropoluentes | Princípio ativo | Marcas | Concentração 1x (concentração ambiental) | Referências (Concentração ambiental) | Concentração 10x | Concentração 25x |
|----------------------|-------------------------|-------------------------------------|--|--|--------------------------------------|--------------------------|---------------------------|
| Fármacos | Antibiótico | Amoxicilina ^a | Prati, Donaduzzi & Cia Ltda, Toledo-PR, Brasil | 0,0045 µg.L ⁻¹ | Sodré et al. (2010) | 0,045 µg.L ⁻¹ | 0,1125 µg.L ⁻¹ |
| | Anti-inflamatório | Ácido acetilsalicílico ^b | Bayer Pharma AG, Leverkusen, Alemanha | 0,34 µg.L ⁻¹ | Ternes (1998) | 3,4 µg.L ⁻¹ | 8,5 µg.L ⁻¹ |
| | | Diclofenaco sódico ^c | Vittamed, Caxias do Sul-RS, Brasil | 1,8 µg.L ⁻¹ | Hoeger et al. (2005) | 18 µg.L ⁻¹ | 45 µg.L ⁻¹ |
| | | Ibuprofeno ^d | TEUTO, Anápolis- GO, Brasil | 2,7 µg.L ⁻¹ | Flippin et al. (2007) | 27 µg.L ⁻¹ | 67,5 µg.L ⁻¹ |
| | Antidepressivo | Fluoxetina ^e | Zydus Nikkho, Rio de Janeiro-RJ, Brasil | 0,030 µg.L ⁻¹ | Perreault et al. (2003) | 0,30 µg.L ⁻¹ | 0,75 µg.L ⁻¹ |
| | Ansiolítico | Clonazepan ^f | Legrand Pharma, Hortolândia- São Paulo, SP, Brasil | 0,053 µg.L ⁻¹ | Ternes et al. (2001) | 0,53 µg.L ⁻¹ | 1,325 µg.L ⁻¹ |
| | Analgésico | Dipirona monoidratada ^g | CIMED, Porto Alegre- MG, Brasil | 5 µg.L ⁻¹ | Pamplona et al. (2011) | 50 µg.L ⁻¹ | 125 µg.L ⁻¹ |
| | Antiácido | Ranitidina ^h | TEUTO, Anápolis- GO, Brasil | 10 ng.L ⁻¹ | Boxall (2004) | 100 ng.L ⁻¹ | 250 ng.L ⁻¹ |

Tabela 1. Continuação.

| Classe dos poluentes | Nome dos micropoluentes | Princípio ativo | Marcas | Concentração 1x (concentração ambiental) | Referências (Concentração ambiental) | Concentração 10x | Concentração 25x |
|-----------------------------|--------------------------------|-------------------------|---|---|---|--------------------------|---------------------------|
| Hidrocarboneto | Benzeno | Benzeno | Proquímios, Rio de Janeiro-RJ, Brasil | 0,005 mg/L | Ministério da Saúde (2004) | 0,05 mg.L ¹ | 0,125 mg.L ¹ |
| Resíduo agroindustrial | Efluente de curtume | - | - | 1% | Rabelo et al. (2016) | 10% | 25% |
| Hormônio Sintético | Estradiol | Ciprionato de Estradiol | ZOETIS PFIZER, Itapevi-SP, Brasil. | 2,6 µg.L ⁻¹ | Jardim et al. (2006) | 26 µg.L ⁻¹ | 65 µg.L ⁻¹ |
| Fertilizante | Nitrogênio | Nitrogênio | USI FERTIL [®] , Maruim-SE, Brasil | 2,4 mg.L ⁻¹ | Xu et al. (2014) | 24 mg.L ⁻¹ | 60 mg.L ⁻¹ |
| Agrotóxico | Glifosato | Glifosato | UPL, Ituverava-SP, Brasil | 0,70 mg.L ⁻¹ | Peruzzo et al. (2008) | 7 mg.L ⁻¹ | 17,5 mg.L ⁻¹ |
| | Kraft [®] 36EC | Abamectina | Bayer CropScience Ltda., Belford Roxo – RJ, Brasil. | 0,004 mg.L ⁻¹ | Vasconcelos et al. (2016) | 0,04 mg.L ⁻¹ | 0,1 mg.L ⁻¹ |
| Surfactante | Detergente | - | Start, São Paulo-SP, Brasil | 740 µg.L ⁻¹ | Mortatti et al., (2012) | 7,400 µg.L ⁻¹ | 18,500 µg.L ⁻¹ |

^aVulliet & Cren-Olivé (2011); Kibuule et al.(2017).

^bCleuvers (2004).

^cCleuvers (2004).

^dTernes (2001); Cleuvers (2004).

^eForan et al. (2004); Evans et al. (2017).

^fLindim et al. (2016).

^gQuadra et al. (2016).

^hQuadra et al. (2016).

A caracterização físico-química da água e dos diferentes tratamentos utilizados no presente estudo foi realizada a partir das recomendações metodológicas da American Public Health Association (APHA) (APHA, 1997). Já para as análises orgânicas, utilizou-se a técnica de espectrometria de massas com ionização por eletrospray (Guimarães et al., 2016). Para isso, as amostras de água e dos diferentes tratamentos foram inicialmente diluídas em metanol (1:1 v/v) completando um volume de 1 mL. Para análises no modo positivo, adicionou-se 0.1 % (v/v) de ácido fórmico (HCOOH - Sigma-Aldrich - St. Louis, MO, USA) na solução; para análises no modo negativo, hidróxido de amônio (NH₄OH - Sigma-Aldrich - St. Louis, MO, USA) (0.1 % v/v) foi adicionado.

As soluções resultantes foram diretamente injetadas na fonte de Electrospray Ionization (ESI) em um fluxo de 5 µL/min. Os experimentos foram realizados utilizando um Q Exactive™ Hybrid Quadrupole-Orbitrap Mass Spectrometer (Bremen, Germany). Outros parâmetros utilizados foram: resolução: 140.000; faixa de massa: 150-1000 m/z; voltagem do spray: 4.0 kV; tempo máximo de injeção: 100 ms; temperatura do capilar: 275 °C; S-lens RF Level: 50 %. As fórmulas moleculares foram geradas utilizando o Xcalibur Analysis software package (version 2.0, Service Release 2, Thermo Electron Corporation), tendo sido aceitas apenas quando as diferenças médias entre as massas teóricas e experimentais foram menores do que 1.0 ppm, sendo pesquisadas utilizando os seguintes íons isotopólogos: ¹²C, ¹H, ¹⁶O, ¹⁴N, ²³Na e ³⁹K.

Partindo-se da hipótese de que a mistura de micropoluentes pudesse alterar o sistema nervoso central dos animais, a partir de 93º dia de exposição os animais foram submetidos a testes de resposta ao predador. No entanto, antes da realização destes testes, a fim de avaliar se os tratamentos causaram alterações em habilidades/capacidades locomotoras, visuais, olfativas e auditivas, as quais pudessem influenciar diretamente a resposta dos camundongos aos predadores, gerando resultados enviesados, todos os animais foram submetidos a paradigmas experimentais que apontam algumas deficiências nessas habilidades. Assim, os camundongos foram submetidos sequencialmente, em dias alternados, ao teste do campo aberto, teste de locomoção induzido por fonte luminosa (teste visual), teste olfatório, teste auditivo e, somente depois, aos testes de resposta aos predadores (felino e ofídico) conforme demonstrado na figura 1.

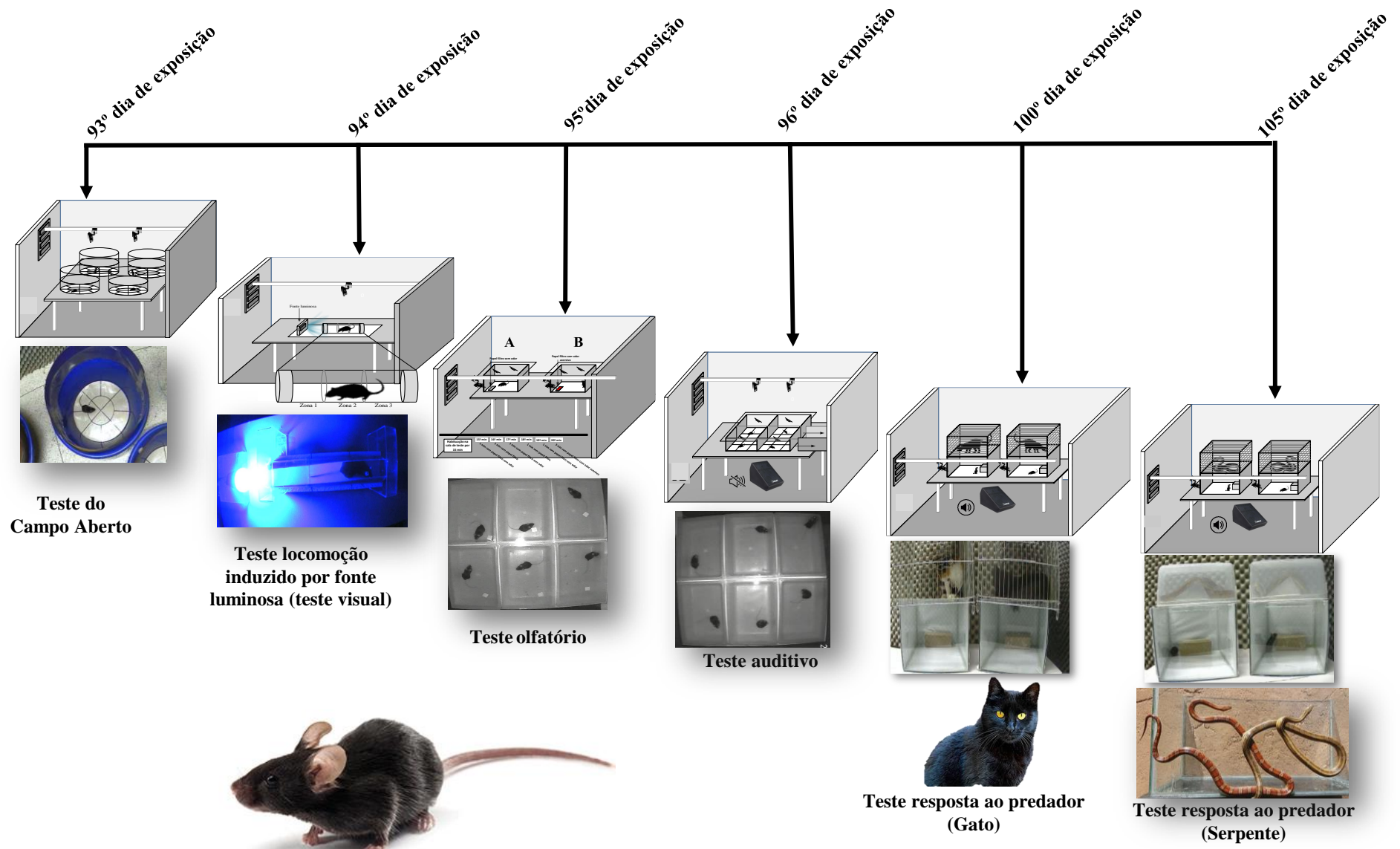


Figura 1. Distribuição temporal dos testes comportamentais em que machos de camundongos C57Bl/6J foram submetidos após a exposição ou não a água contaminada por um mix de poluentes.

Ressalta-se que todos os testes foram realizados em uma sala que possuía isolamento acústico, iluminação artificial (mas com sistema de iluminação conforme descrição detalhada a seguir para cada teste), temperatura controlada (23 a 25°C) e três câmeras de vídeo acopladas a um computador localizado fora da sala (Figura 2). A seguir são apresentados todos os procedimentos adotados na realização de cada teste realizado.

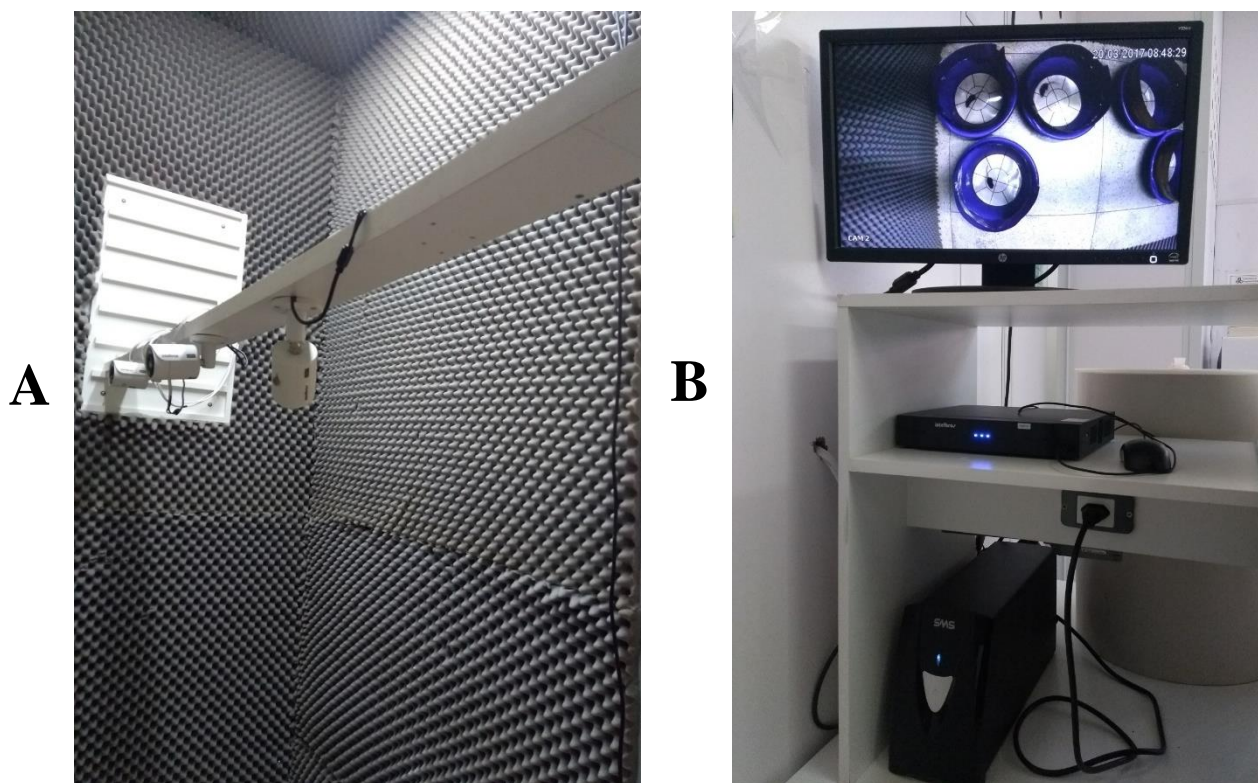


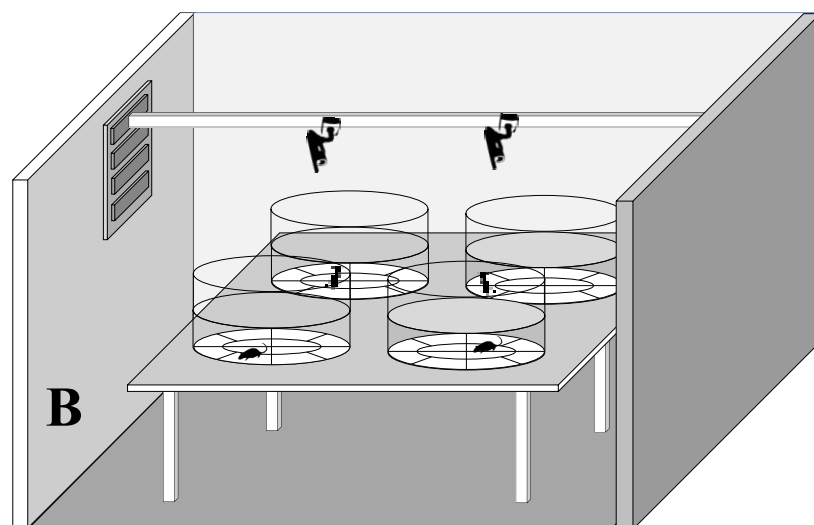
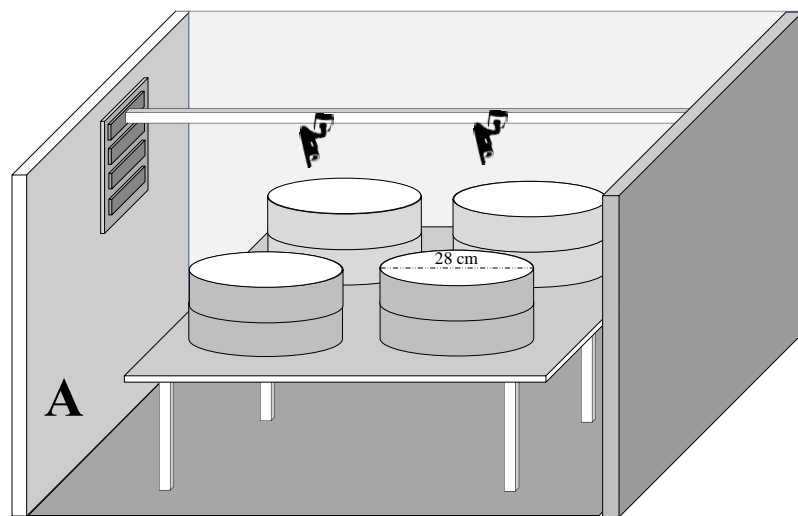
Figura 2. (A) Sala de testes com isolamento acústico, na qual foram realizados os testes comportamentais e (B) computador localizado fora da sala, o qual é acoplado às câmeras de vídeo.

2.3. Testes comportamentais

2.3.1. Teste do campo aberto

O teste do campo aberto é amplamente utilizado para avaliar atividade locomotora e índice de ansiedade em roedores (Carola et al., 2002; Prut & Belzung, 2003). No presente estudo, o teste ocorreu no 93º dia experimental e o aparato utilizado consistiu em uma arena circular de (28 cm de diâmetro) (Figura 3A), rodeada por uma parede circular de 45 cm de altura, com fundo dividido em 12 quadrantes (Figura 3B). A sessão do teste iniciava quando o animal era colocado, individualmente, no centro da arena, sendo filmado, posteriormente por 5 min. Entre uma sessão e outra, o aparato era higienizado com álcool 10%. A atividade locomotora de cada camundongo foi medida a partir da quantidade de cruzamentos entre os

quadrantes (centrais e periféricos) durante o tempo total de filmagem, utilizando-se o *software* OpenFLD. Além disso, calculamos a locomoção animal nos quadrantes centrais/proporção total de locomoção animal, a fim de avaliar o possível efeito ansiogênico ou ansiolítico dos tratamentos nos animais antes de serem submetidos ao teste de resposta anti-predatório. De acordo com Prut & Belzung (2003), a taxa de locomoção mais baixa nos quadrantes centrais e, conseqüentemente, a alta taxa de locomoção nos quadrantes laterais pode ser utilizada como índice de ansiedade.



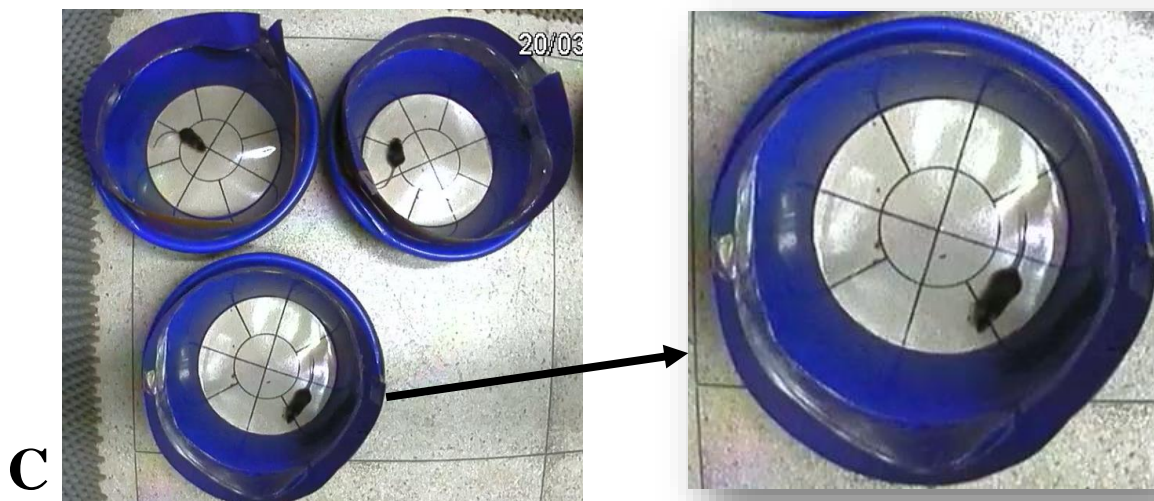


Figura 3. (A) Imagem representativa da vista frontal externa (A) e interna (B) dos aparatos utilizados no teste do campo aberto. As cores e dimensões são meramente ilustrativas. (C) Aparato real utilizado no teste.

Para completar a avaliação da atividade locomotora (com atenção especial dada aos parâmetros biomecânicos) durante o teste de campo aberto, os animais foram avaliados de acordo com os escores estabelecidos pela Basso Mouse Scale (BMS) (Basso et al., 2006) (9-escala de pontos), que é uma escala de classificação amplamente utilizada, validada e semi-quantitativa para avaliação locomotora. Essa escala tem sido considerada uma ferramenta útil para avaliar o desempenho motor de roedores expostos a poluentes de constituição complexa (Mendes et al., 2017).

2.3.2. Teste de locomoção induzido por fonte luminosa (teste visual)

O teste visual foi realizado no 94º dia experimental e utilizado para avaliar se os tratamentos não interferiram na capacidade visual dos animais, o que poderia influenciar sua resposta ao potencial predador. Para isso, foi utilizado o teste de locomoção induzido por fonte luminosa adaptado dos estudos prévios de Johnson et al. (2010), Polosukhina et al. (2012) e Macé et al. (2015). O aparato utilizado neste teste consistiu de um cilíndrico em polietileno transparente (3,8 cm de diâmetro e 28,8 cm de comprimento), sendo que em uma das extremidades havia uma fonte luminosa de luz LED (*Light Emitting Diode*) (azul brilhante – 470 nm) (Figura 4A), localizada a 4,5 cm de distância da extremidade.

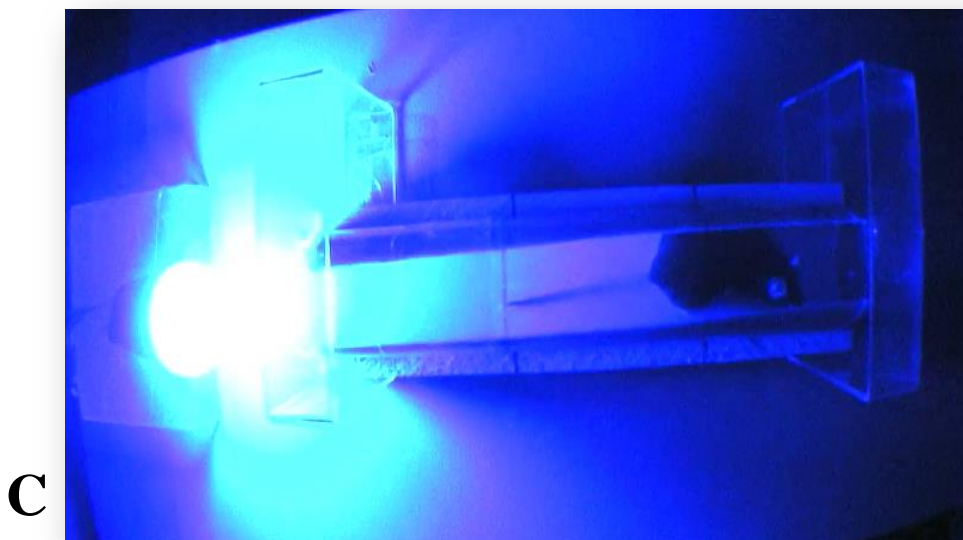
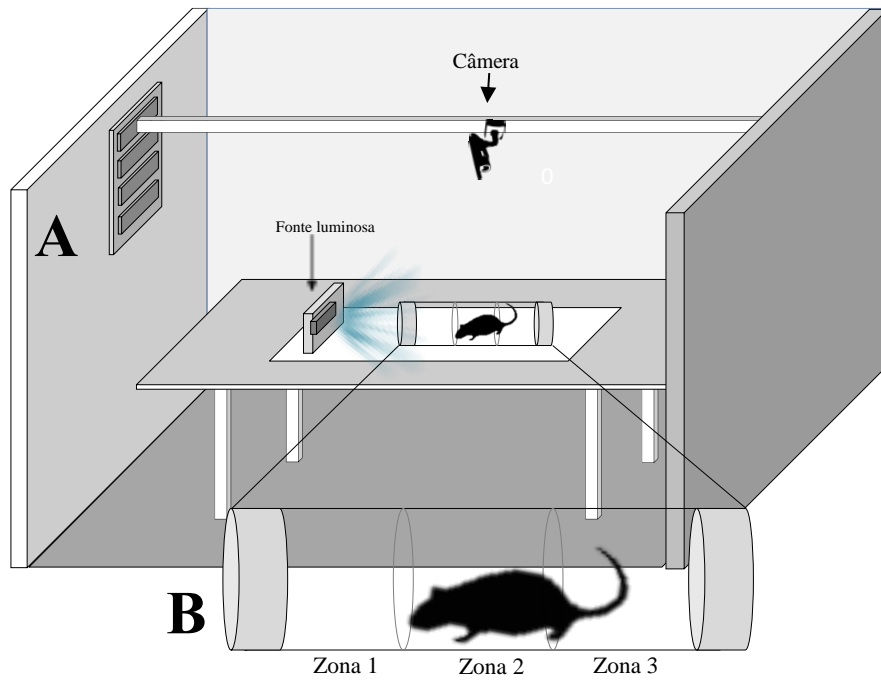


Figura 4. (A) Imagem representativa da vista geral da sala de teste com o aparato utilizado no teste de locomoção induzido por fonte luminosa (teste visual) e (B) detalhe do aparato utilizado, demonstrando as diferentes zonas (1, 2 e 3), utilizadas para aferir a atividade locomotora do animal. As cores e dimensões são meramente ilustrativas. (C) Aparato real utilizado no teste.

Com as luzes da sala de teste apagadas, cada animal era colocado, com o focinho voltado para o lado da fonte luminosa, dentro do aparato, por um período de 2 min para habituação. Após esse período, quando o animal estava com o focinho virado para a fonte luminosa, especificamente na zona 1 (Figura 4B), a luz LED era ligada, permanecendo acesa

ininterruptamente por 2 min. Os períodos de habituação (sem iluminação LED) e de teste (com iluminação LED) foram filmados por meio de uma câmara infravermelho localizada acima do aparato (Figura 4A). Entre uma sessão e outra o aparato era higienizado com álcool 10% e a fonte de luz LED era mudada extremidade, a fim de excluir potenciais influências de preferência para determinada localização espacial da fonte luminosa.

Após as filmagens, avaliou-se a latência para o animal dar uma volta do corpo inteiro depois que a luz LED era ligada, conforme proposto por Johnson et al. (2010). Além disso, avaliou-se a atividade locomotora dos animais no aparato, aferida por meio do total de cruzamentos entre as zonas 1, 2 e 3 traçadas no aparato, conforme demonstrado na Figura 4B, com o auxílio do *software* OpenFLD.

2.3.3. Teste olfatório

No 95º dia experimental foi realizado o teste olfatório³ com o intuito de avaliar se os tratamentos não alteraram as habilidades/capacidades olfatórias dos animais que pudessem influenciar suas performances nos testes de resposta aos predadores. Este teste foi realizado acordo com os procedimentos metodológicos propostos por Kobayakawa et al. (2007), com modificações⁴ em uma caixa de polipropileno padrão para camundongos (nas seguintes dimensões: 30 cm (comprimento) x 20 cm (largura) x 13 cm (altura)), com tampa de vidro transparente (Figura 5). Cada animal era colocado dentro da sala de testes, permanecendo por um período de 15 min para habituação.

Do 15º ao 19º minuto, foi colocado dentro da caixa onde estava o animal um pedaço de papel filtro (2 cm²), contendo 20 µL de água destilada sem qualquer odor (Figura 5A), o qual foi retirado após 1 min. Para cada animal foi utilizado um papel filtro limpo e a água destilada foi colocada no momento do teste, para evitar que a água evaporasse. A posição desses papeis foi alternada a cada minuto, a fim de excluir potenciais influências de preferência para determinada localização espacial.

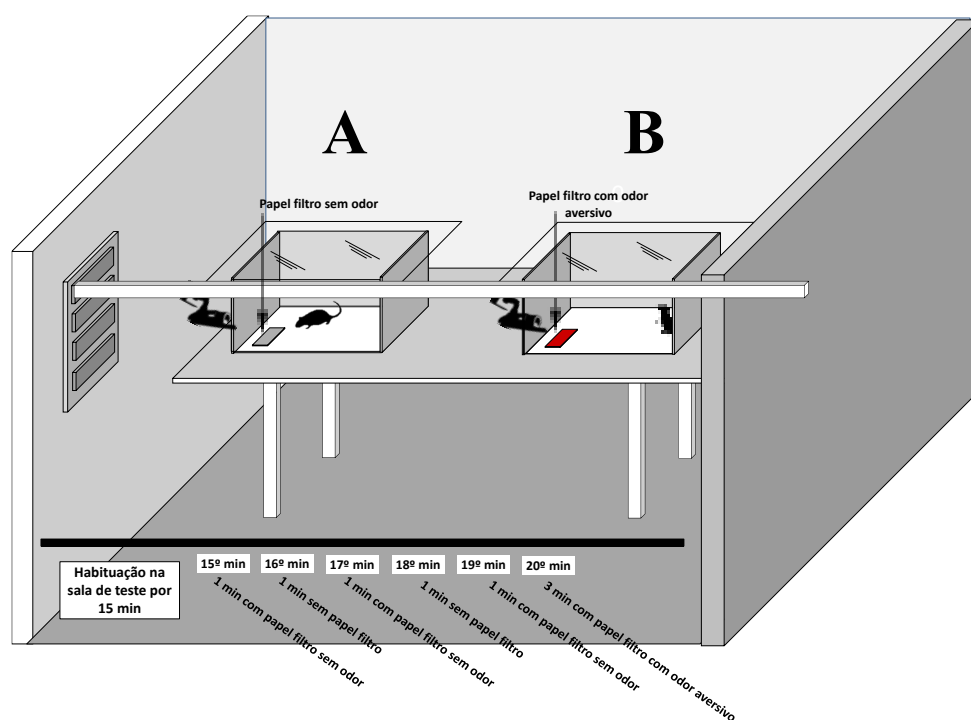
No 20º minuto foi colocado dentro da caixa do animal um papel filtro (2 cm²) com 20 µL de óleo de citronela comercial (ZUPP) (extraído das folhas e caules de diferentes espécies

³O olfato é um dos sentidos mais aguçados dos roedores, por isso, é um dos mecanismos essenciais nas relações inter e intraespecífica. Alterações nesse sentido pode comprometer a existência do indivíduo como por exemplo o não reconhecimento de potenciais predadores influenciando sua resposta defensiva.

⁴Diferente de Kobayakawa et al. (2007), que utilizaram vários odorantes, nós utilizamos apenas um, ou seja, a citronela. Além disso, os animais habituaram por um período de 15 min e não por 30 min, conforme adotado por Kobayakawa et al. (2007).

de *Cymbopogon* spp.) que permaneceu por 3 min (Figura 5B). Para cada camundongo “teste” foi utilizado um papel filtro limpo e o óleo de citronela foi colocado no momento do teste, para evitar que o odor não volatilizasse. Salienta-se que o óleo de citronela foi escolhido, uma vez que estudo prévio já demonstrou que roedores possuem alta sensibilidade ao seu odor, provocando repulsão dos animais (Singla & Kaur, 2014), caracterizando, portanto, um bom indicador de qualidade olfatória em testes experimentais.

Entre uma sessão e outra, o aparato era higienizado com álcool 10%. Além disso, vale salientar que todos os procedimentos foram realizados pelos pesquisadores utilizando-se luvas, máscaras e toucas, sem o uso de perfumes, cremes ou qualquer outro cosmético, evitando-se, portanto, a disseminação de odores que pudessem atrapalhar o teste. As sessões contendo papéis sem odor ou com odor aversivo (óleo de citronela) foram filmadas e o tempo de exploração em cada minuto de exploração do papel filtro com água destilada e com o óleo de citronela foi avaliado.



C

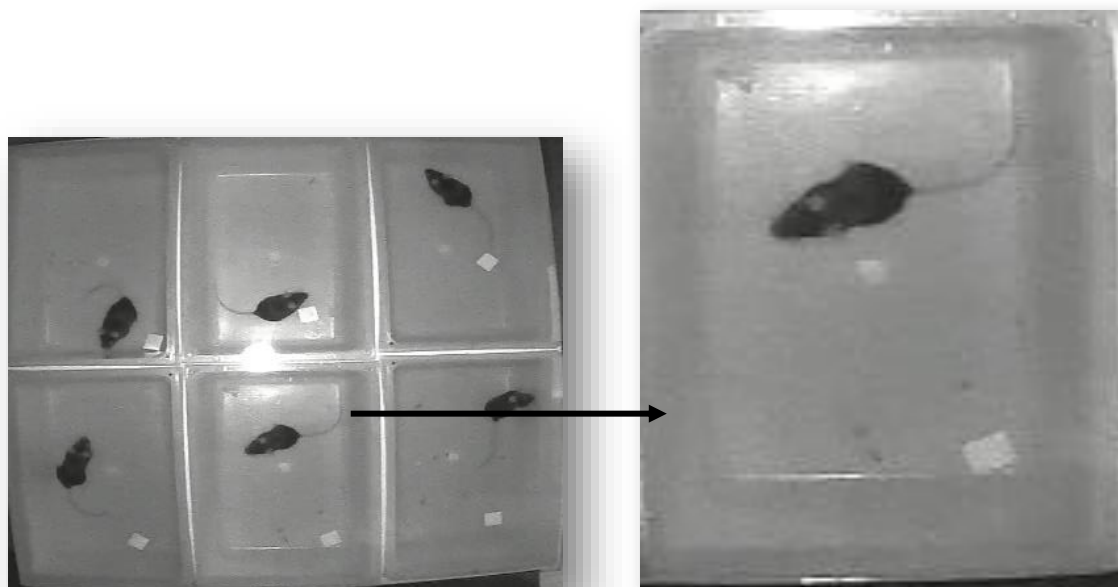


Figura 5. Imagem representativa da vista frontal interna dos aparatos utilizados no teste olfatório com destaque para a sessão do teste em que se utilizou papel filtro sem odor (A) e em que se utilizou papel filtro com odor (B) (óleo de citronela). As cores e dimensões são meramente ilustrativas. (C) Aparato real utilizado no teste.

2.3.4. Teste auditivo

O teste auditivo foi realizado no 96º dia experimental e teve o intuito de avaliar se os tratamentos não alteraram as habilidades/capacidades auditivas dos animais que pudessem influenciar suas performances nos testes de resposta aos predadores. O teste utilizado no presente estudo foi adaptado de Frings et al. (1951), tendo sido realizado em um aparato que comportava seis caixas de polipropileno padrão para camundongos [de dimensões 30 cm (comprimento) x 20 cm (largura) x 13 cm (altura)] com uma tampa de vidro transparente que cobria todas as caixas simultaneamente (Figura 6A).

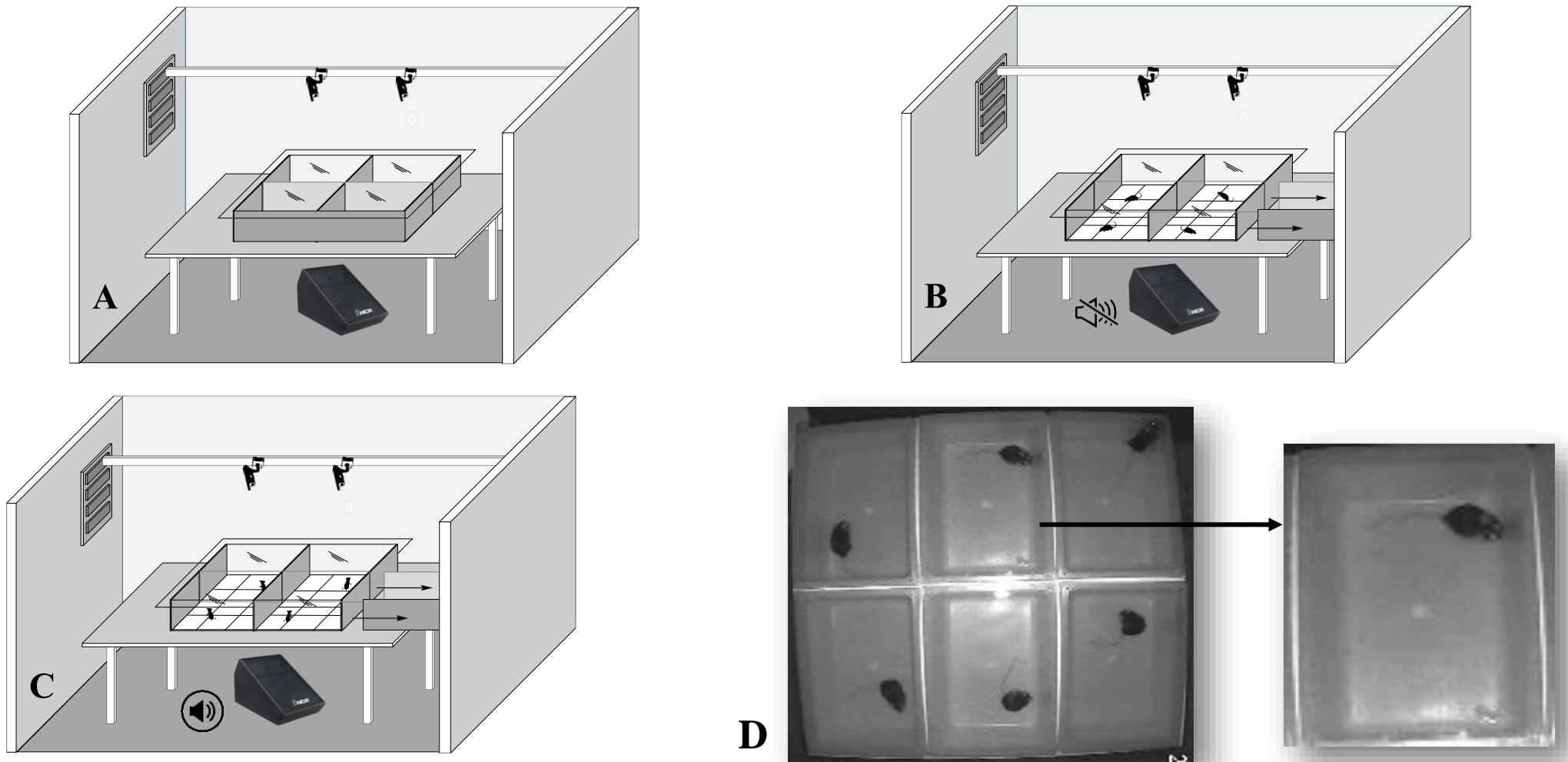


Figura 6. (A) Imagem representativa da vista frontal externa do aparato utilizado no teste auditivo na sala de teste. (B) Imagem representativa da vista frontal interna do aparato do teste auditivo e dos animais durante a sessão com o som desligado e com o (C) som ligado na sala de teste. As cores e dimensões são meramente ilustrativa. Em “B” e “C” as setas estão ilustrando que as “paredes” das caixas foram retiradas para que o interior do aparato possa ser visualizado. (D) Aparato real utilizado no teste.

Após serem colocados nas caixas, os animais permaneciam na sala de testes por 5 min (período de habituação). Em seguida, um som era ligado e reproduzido por uma caixa de som (nas dimensões 52,5 cm (comprimento) x 25 cm (largura) x 64,5 cm (altura) – localizada na sala de testes) (Figura 6B), mantido ininterruptamente aos 90 dB durante 5 min, adaptado de Frings et al. (1951). Entre uma sessão e outra o aparato era higienizado com álcool 10%.

Tanto a habituação quanto o teste foram filmados e após as filmagens, os seguintes parâmetros foram analisados: atividade locomotora, tempo (s) e frequência de *freezing* (Figura 7A) e *self-grooming* (Figura 7B)– todos durante o período de habituação e durante o teste. Ressalta-se que a atividade locomotora dos camundongos foi avaliada pelo número de cruzamentos de três linhas virtuais que dividiram cada caixa em seis setores na tela durante a análise das filmagens (Figura 6C).

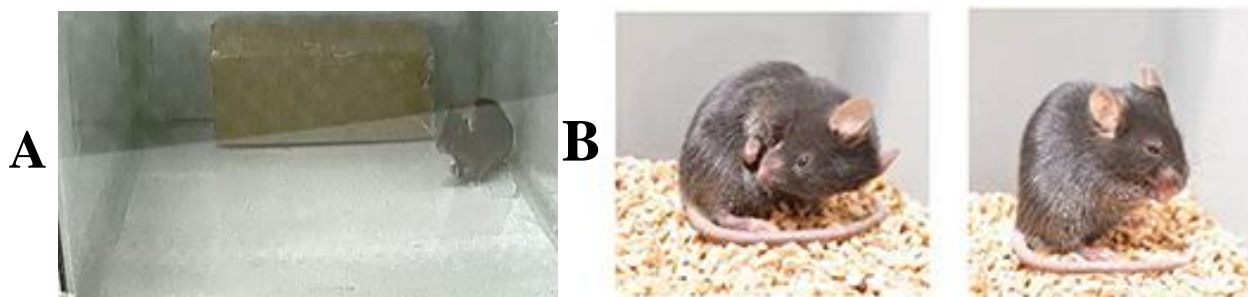


Figura 7. (A) Imagem ilustrando o comportamento de *freezing* (Fonte: Arquivo pessoal) e (B) ilustrando o comportamento de *self-grooming* (Fonte: Henrique-Alves & Queiroz (2016)).

2.3.5. Testes de resposta ao predador

Após a realização dos testes que avaliaram possíveis alterações nas habilidades/capacidades locomotoras, visuais, olfativas e auditivas, a partir do 100º dia experimental, os camundongos foram submetidos a dois testes específicos a fim de testar a hipótese de que os tratamentos pudessem afetar o sistema nervoso central dos animais, prejudicando a resposta inata a seus potenciais predadores. Neste caso, os animais foram expostos a um gato e a uma serpente⁵, vivos, utilizados como potenciais predadores, vistos que são predadores naturais de camundongos (Papes et al., 2010). O aparato impedia o contato físico dos predadores com os camundongos, mas oferecia a eles o estímulo visual, olfatório e

⁵Foram utilizados dois potenciais predadores, um felino e um ofídico, com o propósito de aproveitar o robusto desing experimental e avaliar as respostas dos camundongos diante os predadores. No presente trabalho foi utilizado potenciais predadores vivos, a fim de colocar os camundongos expostos a todos os estímulos proporcionados pelo predador, sendo eles: visuais, olfatórios e auditivos, utilizando estímulos relevantes a fim de gerar respostas relevantes.

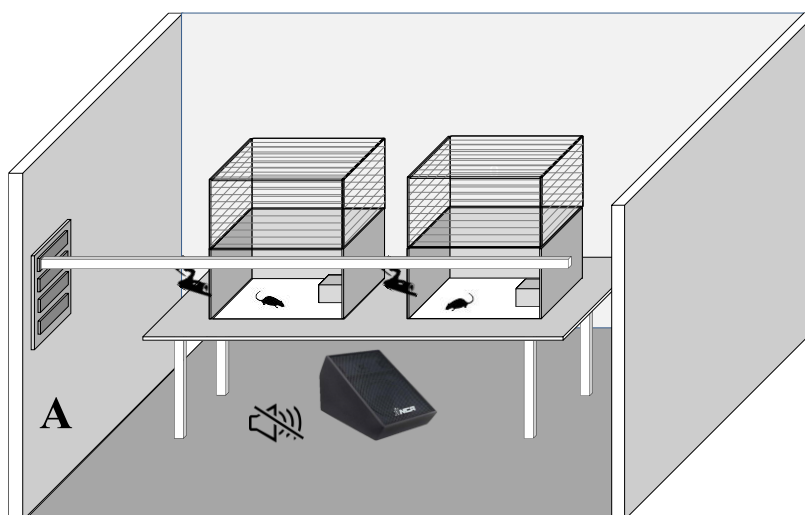
auditivo. A seguir são apresentados os detalhes dos procedimentos adotados nos respectivos testes.

2.3.5.1. Teste de resposta a um predador felino (gato)

No 100º dia experimental, os animais foram submetidos ao teste de resposta a um predador felino, adaptado do estudo de Mendes et al. (2017). O aparato utilizado consistiu em um aquário de vidro [nas seguintes dimensões: 35 cm (comprimento) x 25 cm (largura) x 20 cm (altura)], sobre o qual continha uma gaiola acoplada nas mesmas dimensões. Ressalta-se que as paredes laterais do aquário eram branco fosco e apenas a parede frontal e o teto do aquário eram de vidro transparente. No interior do aquário havia uma toca, nas dimensões: 35 cm (comprimento) x 25 cm (largura) x 20 cm (altura) (Figura 8), a qual simulou um abrigo/refúgio para os camundongos.

Foram utilizados como predadores felinos dois gatos domésticos (*Felis catus*), machos em cores diferentes (preto e aguoti), mesma idade (3 anos) os quais foram deixados em jejum por um período de 8 h antes da realização do teste, visando estimular seu instinto predatório. Ressalta-se que cada gato foi utilizado no teste de um camundongo, pois as filmagens dos camundongos ocorreram aos pares na mesma sala de testes, sendo, necessários, portanto, dois predadores felinos.

O teste ocorreu em duas sessões. Na primeira sessão, cada camundongo foi colocado dentro do aquário na sala de teste, sendo que a gaiola sobre o aquário permaneceu vazia, sem o gato (Figura 8A). Cada camundongo era colocado individualmente no interior do aquário e deixado explorar o novo ambiente por 5 min (período de habituação). Em seguida, o animal era retirado e levado para sua caixa residência novamente. Entre uma sessão e outra o aquário era higienizado com álcool 10%.



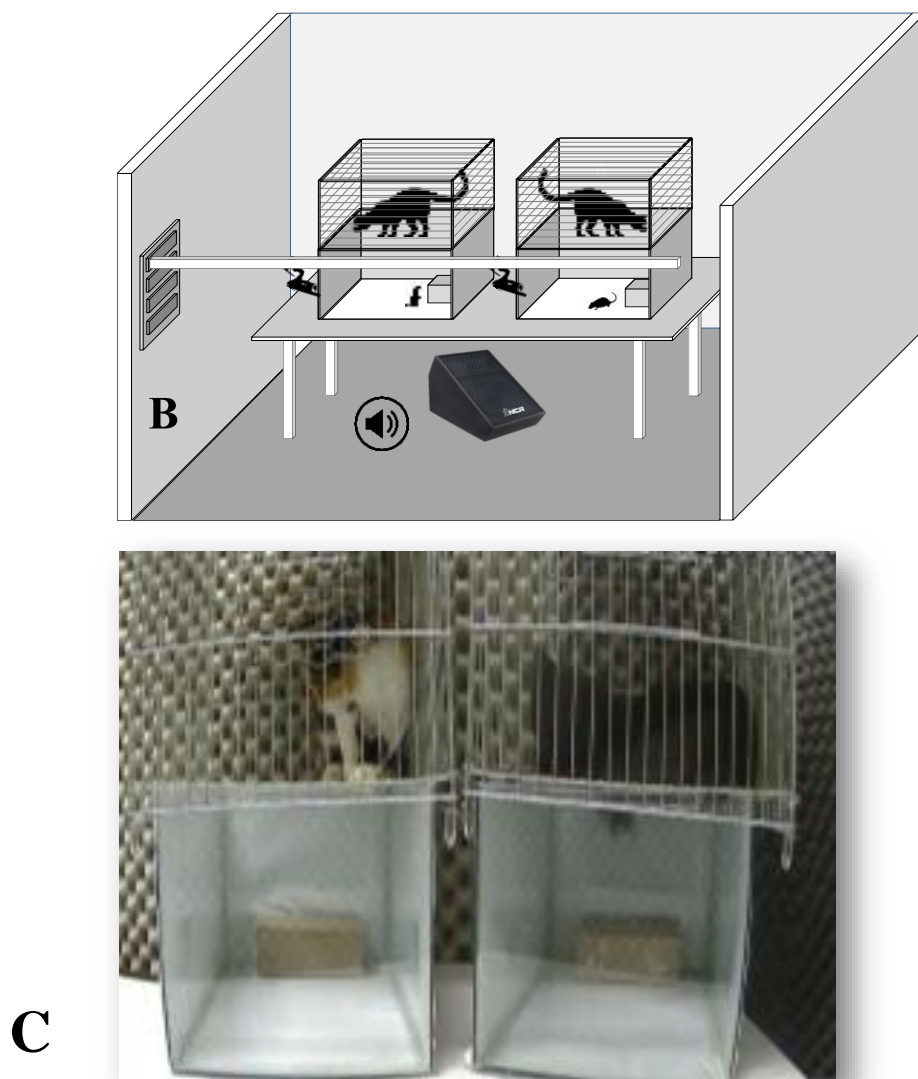


Figura 8. Imagem representativa da vista frontal interna dos aparatos utilizados na (A) sessão sem estímulo predatório e (B) na sessão com estímulo predatório do teste de resposta ao predador felino na sala de teste. As cores são meramente ilustrativas. (C) Aparato real utilizado no teste.

Somente quando os animais de todos os grupos passaram pela primeira sessão do teste⁶, a segunda sessão foi iniciada. Nessa sessão, logo após o camundongo ser introduzido no aquário, uma gaiola com as mesmas dimensões daquela utilizada na primeira sessão do teste, porém, contendo o gato, foi colocada sobre o aquário (Figura 8B). Além disso, um som (com duração de 30 s) de um gato vocalizando a 65 dB também era reproduzido em intervalo de 30 s, garantindo ao camundongo o estímulo sonoro do predador ao longo da sessão do teste. Ressalta-se que o som reproduzido foi gravado previamente pelos pesquisadores utilizando-se

⁶Esse procedimento foi adotado a fim de evitar que na primeira sessão (sessão habituação) houvesse qualquer odor dos predadores na sala ou no aparato, evitando assim resultados enviesados.

os mesmos gatos utilizados nos testes, na própria sala de testes, semanas antes do teste comportamental. O volume do som reproduzido foi determinado por meio da aferição da vocalização dos animais, utilizando-se um decibelímetro digital.

Após o acoplamento da gaiola contendo o gato ao aquário (Figura 8C), o camundongo era filmado por mais 5 min. Novamente, entre uma sessão e outra o aparato era higienizado com álcool 10%. Após as filmagens, os seguintes parâmetros foram analisados: i) tempo (s) de permanência do camundongo na toca (na ausência e na presença do gato) e ii) tempo (s) dos comportamentos de *freezing* e *self-grooming* (na ausência e na presença do gato).

2.3.5.2. Teste de resposta a um predador ofídico (serpente)

O teste de resposta a um predador ofídico foi realizado no 105º dia experimental, tendo utilizado como predador duas *Corn Snake* ou cobras-do-milho (*Pantherophis guttatus*) as quais, podem se alimentar, dentre outros alimentos, de camundongos (Smith & Watson, 1972). As serpentes utilizadas eram adultas, no mesmo padrão (*Okeetee* – normal ou comum), do mesmo sexo (macho), mesma idade (4 anos) e no dia do teste haviam 2 meses que estavam em jejum.

Tais serpentes eram de propriedade do Jardim Zoológico de Goiânia e foram cedidas exclusivamente para a realização do teste e posteriormente devolvidas. Ressalta-se que semelhantemente às filmagens com os gatos, cada serpente foi utilizada na realização do teste de um camundongo. As filmagens dos camundongos ocorreram aos pares na mesma sala de testes e, portanto, foram necessários dois predadores ofídicos.

Os aparatos utilizados no teste de resposta a um predador ofídico foram idênticos em dimensão, em material (aquários), cores e formato aos utilizados no teste envolvendo o predador felino, bem como os procedimentos metodológicos. Na primeira sessão os camundongos exploraram o aquário por 5 min sem a presença da serpente sobre o aquário (Figura 9A) e na segunda sessão o estímulo predatório era introduzido (Figura 9B). Simultaneamente, um som de uma serpente (baixado da internet) a 65 dB também era reproduzido (de duração de 30 s, em intervalo de 30 s), visando garantir ao camundongo “teste” o estímulo sonoro do potencial predador ofídico ao longo da sessão do teste, assim como ocorreu para o predador felino. O camundongo teste também foi filmado por mais 5 min e após as filmagens, os seguintes parâmetros foram analisados: tempo (s) de permanência do camundongo na toca (na ausência e na presença da serpente) e tempo (s) dos comportamentos de *freezing* e *self-grooming* (na ausência e na presença da serpente).

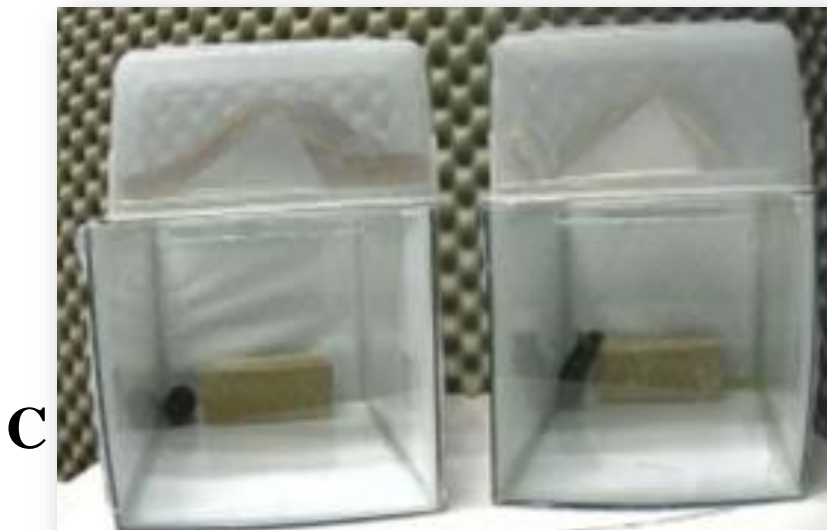
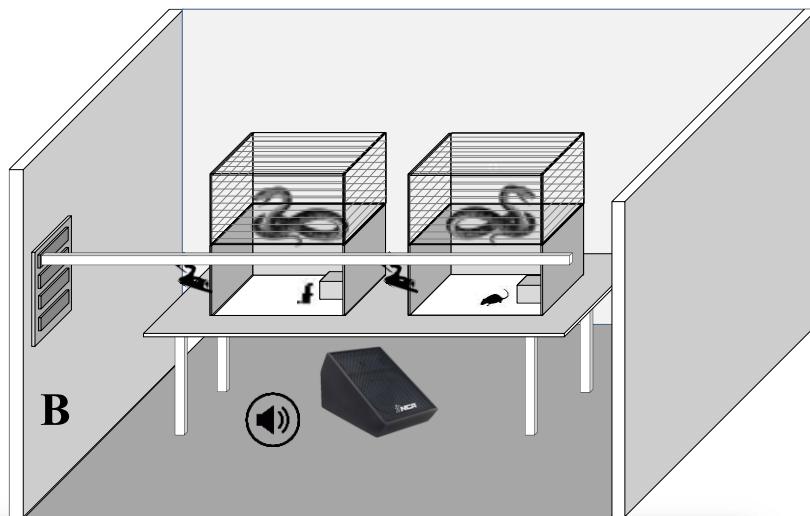
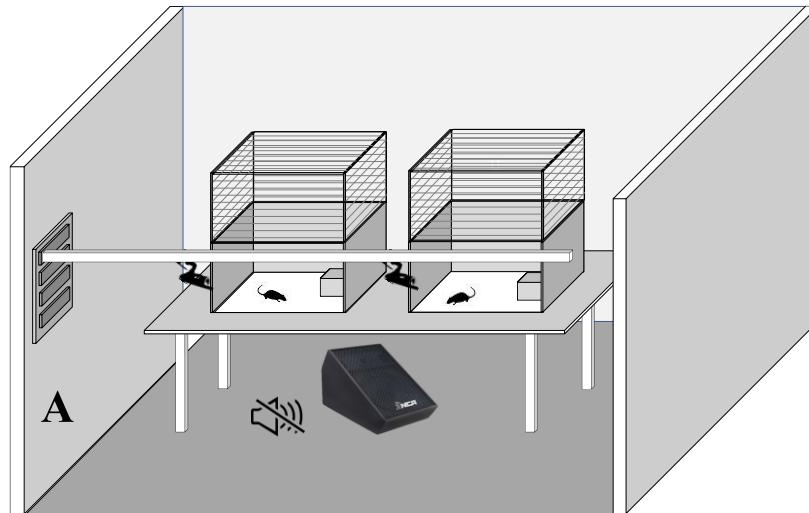


Figura 9. Imagem representativa da vista frontal interna dos aparatos utilizados na (A) sessão sem estímulo predatório e (B) na sessão com estímulo predatório do teste de resposta ao predador ofídico na sala de teste. As cores e dimensões são meramente ilustrativas. (C) Aparato real utilizado no teste.

2.4. Massa corpórea e massa relativa de órgãos

A massa corpórea dos animais foi aferida inicialmente e ao final do período experimental. Além disso, no dia seguinte à finalização do último dia do teste comportamental, foi realizada a eutanásia dos animais, o cérebro, fígado, baço e rins foram dissecados e pesados. A massa relativa desses órgãos foi calculada, a fim de avaliar possível toxicidade sistêmica. Para isso, dividiu-se a massa de cada órgão (g) pela biomassa corpórea do animal (g) (aferida no dia da eutanásia) conforme realizado por Estrela et al. (2014).

2.5. Bioacumulação de cromo e magnésio

Considerando que o Cr e Mg foram elementos químicos identificados em grande concentração nos tratamentos, os mesmos foram escolhidos como parâmetro para avaliar bioacumulação no presente estudo. Logo, suas concentrações foram aferidas no sangue dos animais, a fim de avaliar uma possível ligação entre a absorção do mix de poluentes, bem como a *performance* dos animais nos testes comportamentais realizados, especialmente nos testes de respostas aos predadores. Ressalta-se que a quantificação desses elementos no sangue deu-se em função do mesmo ser considerado o principal fluido de distribuição para os demais sistemas, quer seja de nutrientes quer seja agentes tóxicos (Perez-Gonzalez et al., 2017).

As concentrações de Cr e Mg foram quantificadas por Espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) (Element, Finnigan MAT, Alemanha), de acordo com o método proposto por Li et al. (2012), com algumas modificações. Resumidamente, o sangue foi digerido em um erlenmeyer de rosca contendo 2 mL de solução de digestão húmida (ácido nítrico a 75 % (HNO₃): 70 % de ácido perclórico (HClO₄) = 1: 1 v/v). Posteriormente, as amostras foram colocadas em uma placa aquecedora durante 6 h a 100 °C. Após a digestão das amostras, a tampa (vidro relógio) foi removida e o processo de aquecimento continuou a 80°C até a secagem total. Em seguida, adicionou-se 5% de HNO₃ para dissolver o resíduo da amostra, completando o volume final para 5 mL. A solução resultante foi então diluída em 5 % de HNO₃ e a diluição total correspondia a 5000 vezes o peso original da amostra. A solução foi então analisada através de ICP-MS. Utilizamos os padrões de calibração 0,1, 1,0 e 10 mg.kg⁻¹ Cr e Mg para validar o método.

2.6. Análise estatísticas

Inicialmente todos os dados foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk, que foi seguido pelo teste de variância de homogeneidade Levene. Os dados referentes à massa relativa dos órgãos coletados ao final do experimento, aos dados do teste de campo aberto e do teste de locomoção induzido por fonte luminosa (teste visual) foram submetidos à análise de variância simples (*one-way* ANOVA), com pós-teste de Tukey a 5% de probabilidade, nos casos de F significativos. Os dados que não apresentaram distribuição normal foram submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis a 5% de probabilidade.

Por outro lado, os dados referentes à massa corpórea e aos testes olfatório, auditivo e de resposta aos predadores (felino e ofídicos) foram submetidos à análise de variância (*two-way* ANOVA), de acordo com o projeto fatorial (2 x 4), utilizando os fatores “tratamento” (quatro níveis: controle e grupos Mix 1x, Mix 10x e Mix 25x) e o fator “tempo” (dois níveis: início e fim do experimento – no caso dos dados de massa corpórea) ou fator “estímulo 1” (dois níveis: sem e com estímulo olfatório – óleo de citronela (no caso do teste olfatório); ou “estímulo 2” (dois níveis: sem e com estímulo auditivo – som de 90 dB (no caso do teste auditivo); ou “estímulo 3” (dois níveis: sem e com estímulo predatório felino – gato (no caso do teste de resposta ao predador felino) ou “estímulo 4” (dois níveis) (dois níveis: sem e com estímulo predatório ofídico – cobras-do-milho (no caso do teste de resposta ao predador ofídico). Nos casos de F significativo, foi aplicado o pós-teste de Tukey a 5% de probabilidade. Ressalta-se que os dados não paramétricos foram transformados em $\log(x)$ para somente, *a posteriori*, serem submetidos à ANOVA fatorial.

Além disso, foram realizadas análises de correlação entre as concentrações de Cr e Mg encontradas no cérebro e sangue dos animais e parâmetros comportamentais analisados em diferentes testes realizados, por meio do método de Spearman. Além disso, a análise de regressão foi realizada quando diferenças significativas foram detectadas entre diferentes tratamentos. Ressalta-se que todas as análises foram realizadas no *software* GraphPad Prism (versão 6.0). Além disso, todos os gráficos foram confeccionados no referido *software*.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Caracterização química do mix de poluente

Todos os compostos detectados na caracterização físico-química da água e dos diferentes tratamentos utilizados no presente estudo são demonstrados na Tabela 2.

Tabela 2. Caracterização físico-química e química da água potável e dos tratamentos contendo mix de poluentes em concentração ambiental (1x), em concentração 10 e 25 vezes superiores oferecidos a machos de camundongos C57Bl/6J.

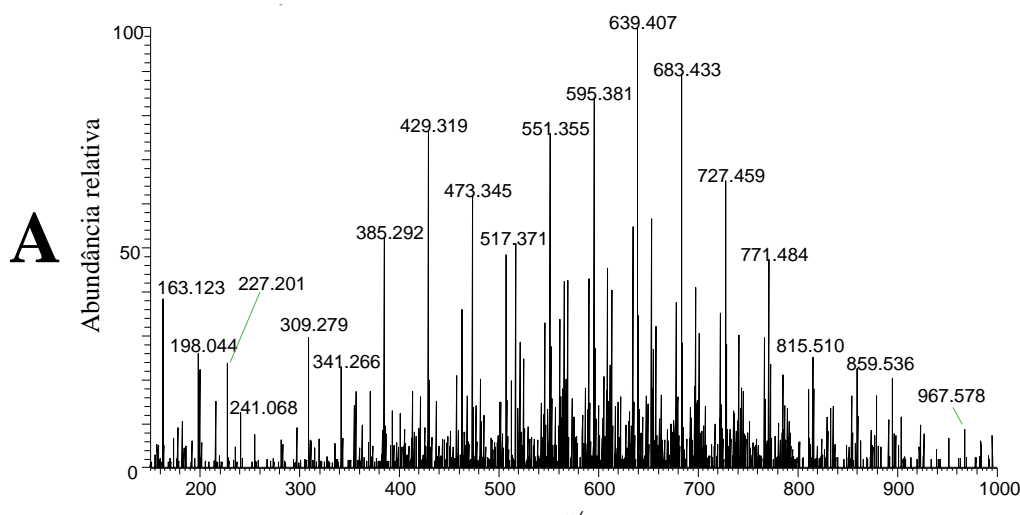
| Atributos | Água potável | Mix (100%) | Mix (1x) | Mix (10x) | Mix (25x) |
|---|--------------|------------|----------|-----------|-----------|
| pH (UpH) | 6,40 | 3,800 | 5,700 | 4,800 | 4,400 |
| DBO** | 4,00 | 836,000 | 12,320 | 87,200 | 212,000 |
| DQO*** | 8,00 | 1692,000 | 24,840 | 176,400 | 429,000 |
| Sólidos totais | 28,40 | 671,600 | 34,832 | 92,720 | 189,200 |
| Turbidez | 2,00 | 238,000 | 4,360 | 25,600 | 61,000 |
| Condutividade elétrica ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$) | 54,00 | 1404,000 | 67,500 | 189,000 | 391,500 |
| F total | 0,40 | 19,600 | 0,592 | 2,320 | 5,200 |
| N orgânico | 0,00 | 28,000 | 0,280 | 2,800 | 7,000 |
| S ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) | 7,07 | 3,330 | 7,033 | 6,696 | 6,135 |
| As total ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) | NID* | NID* | NID* | NID* | NID* |
| Pb total ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) | 0,02 | 0,048 | 0,018 | 0,021 | 0,026 |
| Cu dissolvido ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) | 0,04 | 0,073 | 0,037 | 0,041 | 0,046 |
| Fe dissolvido ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) | 0,30 | 0,720 | 0,304 | 0,342 | 0,405 |
| Mn total ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) | 0,01 | 0,039 | 0,011 | 0,014 | 0,018 |
| Ni total ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) | 0,01 | 0,037 | 0,013 | 0,015 | 0,019 |
| Zn total ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) | NID | 0,036 | NID | 0,004 | 0,009 |
| K total ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) | 2,44 | 9,180 | 2,507 | 3,114 | 4,125 |
| Al total ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) | 0,12 | 0,920 | 0,128 | 0,200 | 0,320 |
| Mg total ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) | 1,52 | 57,480 | 2,080 | 7,116 | 15,510 |
| Co total ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) | 0,02 | 0,026 | 0,020 | 0,021 | 0,022 |
| Cr total ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) | NID | 8,590 | 0,086 | 0,859 | 2,148 |

*NID: Não identificado – abaixo do limite de quantificação da técnica.

**DBO: Demanda Biológica de Oxigênio

***DQO: Demanda Química de Oxigênio

Nas análises orgânicas os espectros de massa obtidos para amostra referente ao tratamento do grupo Mix 25x e os compostos orgânicos identificados na água e nos demais tratamentos podem ser observados na Figura 10 e na Tabela 3, respectivamente.



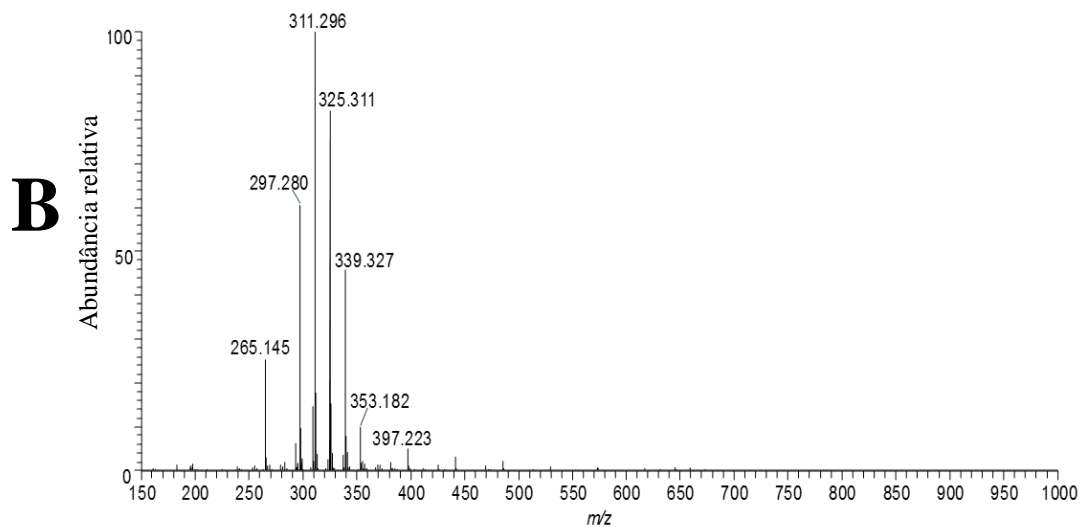


Figura 10. Espectros de massas para amostra referente ao tratamento do grupo Mix 25x obtido por meio da ESI (+) Orbitrap MS (A) e ESI (-) Orbitrap MS (B).

Tabela 3. Fórmulas moleculares identificadas aos íons mais intensos detectados na amostra referente ao tratamento do grupo Mix 25x obtidas por meio da ESI(-) Orbitrap MS e ESI(+) Orbitrap MS. Todos os íons foram detectados como $[H-H]^-$.

| Identificação | m/z^1 | Error (ppm) ² | RDB ³ | Fórmula molecular | Nome dos compostos orgânicos |
|--------------------|-----------|--------------------------|------------------|-----------------------------|---|
| ESI(+) Orbitrap MS | | | | | |
| 1 | 227,20050 | -0,249 | 1,5 | $[C_{14}H_{26}O_2^+H]^+$ | 3,7-Dimethyloct-6-en-1-yl 2-methylpropanoate |
| 2 | 241,06814 | 0,161 | 6,5 | $[C_7H_8O_4N_6^+H]^+$ | 1-(4-Amino-1,2,5-oxadiazol-3-yl)-5-(methoxymethyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carboxylic acid |
| 3 | 309,27866 | -0,475 | 2,5 | $[C_{20}H_{36}O_2^+H]^+$ | Ethyl linoleate (JAN) |
| 4 | 341,26608 | 0,379 | 3,5 | $[C_{16}H_{32}O_2N_6^+H]^+$ | N,N'-[1,2-Ethanediy]bis(oxy-2,1-ethanediy)]bis(1,3-dimethyl-2-imidazolidinimine) |
| 5 | 385,29224 | 0,193 | 3,5 | $[C_{18}H_{36}O_3N_6^+H]^+$ | N,N'-[Oxybis(2,1-ethanediyloxy-2,1-ethanediy)]bis(4,5,6,7-tetrahydro-1H-1,3-diazepin-2-amine) |

| | | | | | |
|---|-----------|-------|-----|-----------------------------|--|
| 6 | 429,31863 | 0,582 | 3,5 | $[C_{20}H_{40}O_4N_6^+H]^+$ | L-Leucyl-L-isoleucylglycyl-L-lysineamide |
| 7 | 473,34503 | 0,919 | 3,5 | $[C_{22}H_{44}O_5N_6^+H]^+$ | N-(11-Aminoundecanoyl)-L-seryl-L-lysylglycinamide |
| 8 | 517,37109 | 0,542 | 3,5 | $[C_{24}H_{48}O_6N_6^+H]^+$ | 1,3,5-Tris[3-(diethylamino)-2-hydroxypropyl]-1,3,5-triazinane-2,4,6-trione |

ESI(-) Orbitrap MS

| 1 | 265,14469 | 0,593 | 5,5 | $C_{15}H_{21}O_4$ | 3,4-Dibutoxybenzoic acid |
|---------------|-----------|--------------------------|------------------|-------------------|------------------------------|
| 2 | 297,27991 | 0,020 | 1,5 | $C_{19}H_{37}O_2$ | Nonadecanoic acid |
| 3 | 311,29568 | 0,405 | 1,5 | $C_{20}H_{39}O_2$ | Icosanoic acid |
| Identificação | m/z^1 | Error (ppm) ² | RDB ³ | Fórmula molecular | Nome dos compostos orgânicos |

ESI(-) Orbitrap MS

| | | | | | |
|---|-----------|--------|-----|-------------------|---|
| 4 | 325,31125 | 0,141 | 1,5 | $C_{21}H_{41}O_2$ | Heneicosylic acid |
| 5 | 339,32691 | 0,164 | 1,5 | $C_{22}H_{43}O_2$ | Behenic acid |
| 6 | 353,18165 | -0,159 | 1,5 | $C_{15}H_{29}O_9$ | 1-Hydroxy-3,6,9,12,15,18-hexaoxahenicosan-21-oic acid |
| 7 | 397,22334 | 0,410 | 5,5 | $C_{21}H_{33}O_7$ | 2-[(2S)-6-Hydroxy-6-methyl-2-heptyl]-5-methylphenyl α -D-glucopyranoside |

¹Representa massa dividida pelo número de carga e o eixo horizontal em um espectro de massa é expresso em uma unidade de m/z .

²Representa o erro de massa de uma atribuição, ao comparar uma m/z teórica e uma m/z observada experimentalmente.

³RDB – anel/de dupla ligação equivalente

3.2. Biometria

Inicialmente, as análises estatísticas revelam efeito apenas do fator “tempo” sobre a massa corporal dos animais, sendo que ao final do experimento todos os grupos apresentaram um incremento da sua massa corpórea em relação àquela aferida no início do experimento (Figura 11A). Por outro lado, observamos que os animais do grupo Mix 25x apresentaram menor consumo médio de ração em relação ao controle e Mix 1x (Figura 11B), assim como os camundongos dos grupos Mix 10x e Mix 25x ingeriram menor quantidade de água em relação ao controle e Mix 1x (Figura 11C).

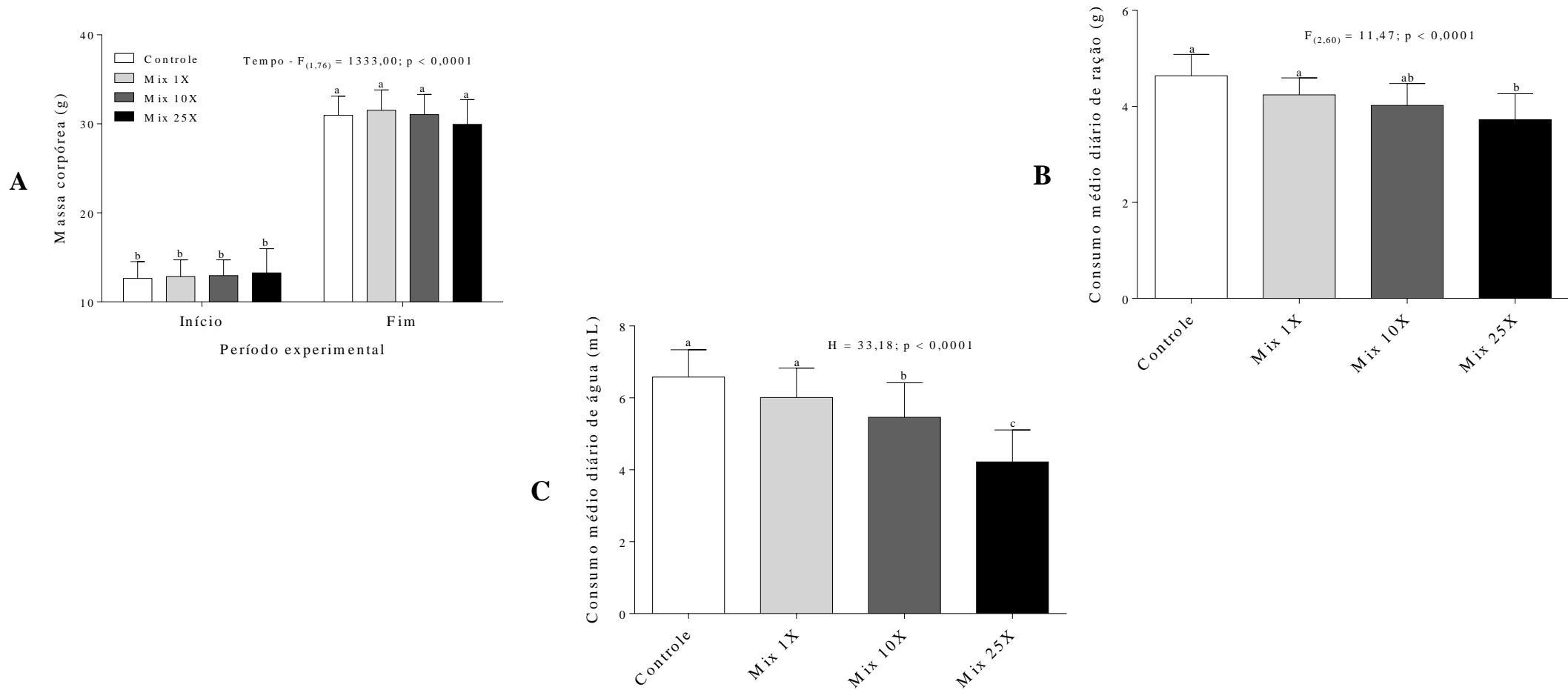
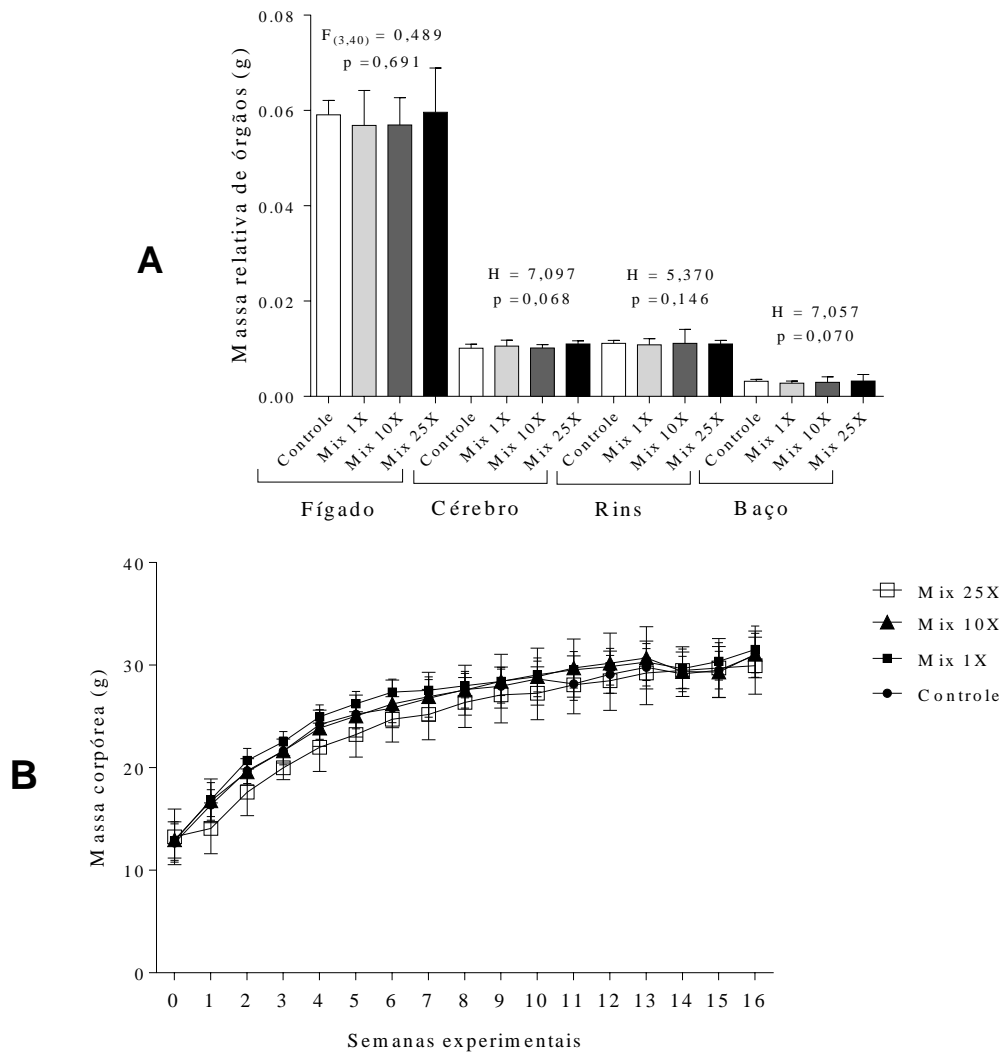


Figura 11. (A) Massa corpórea (g), (B) consumo médio diário de ração (g) e (C) consumo médio diário de água (mL) dos machos de camundongos da linhagem C57Bl/6J expostos ou não à água contaminada nas concentrações Mix 1x, Mix 10x e Mix 25x. As barras indicam a média \pm desvio padrão. Letras diferentes significam diferenças estatística. Em “A” os dados foram submetidos a *two-way* ANOVA com pós-teste de Tukey, a 5% e probabilidade. Em “B” os dados foram submetidos *one-way* ANOVA com pós-teste Tukey, a 5 % de probabilidade e em “C” os dados foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis com pós-teste Dunn’s, a 5% de probabilidade.

Conforme demonstrado por Malafaia et al. (2015), a biomassa e o consumo de água e ração são variáveis diretamente relacionadas com efeitos tóxicos animais. Nossos dados, curiosamente, demonstram que apesar do reduzido consumo de água e ração dos grupos tratamentos (Mix 10 e 25x), a massa corporal final desses animais não sofreu alterações significativas. Nesse caso, é provável que a ingestão de água contaminada com um mix de poluente tenha causado nesses animais, especialmente naqueles expostos à maior concentração, mudanças metabólicas que podem estar relacionadas à maior eficiência energética⁷. Isso é corroborado pela ausência de diferenças na massa relativa de órgãos metabolicamente ativos (fígado, cérebro, rins e baço) (Figura 12A) e pelos os dados que mostram que não houve diferença significativas na massa corpórea durante as semanas experimentais (Figura 12B), bem como por estudos prévios que evidenciaram que situações de restrição alimentar crônica podem levar o organismo às adaptações metabólicas que garantem a manutenção da integridade física dos animais (Trexler et al., 2014).



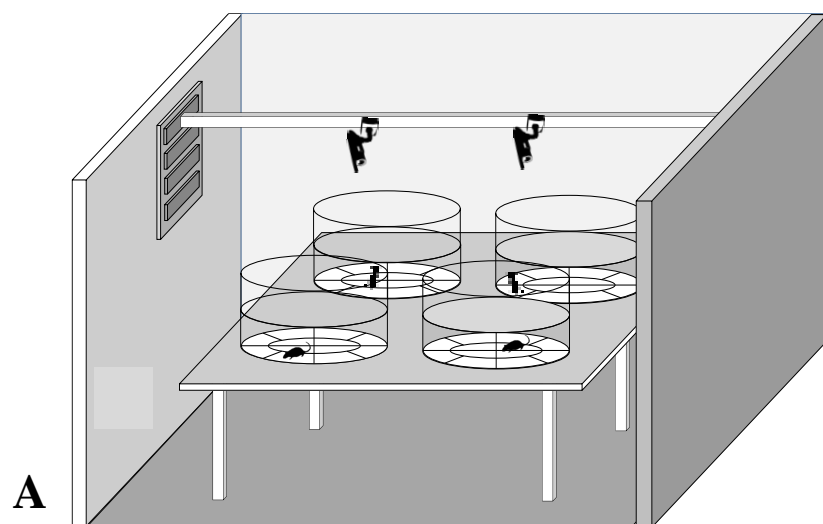
⁷A eficiência energética está relacionada com o ganho ou perda de massa corpórea em relação a energia ingerida.

Figura 12. (A) Massa relativa dos órgãos (Fígado, Cérebro, Rins e Baço), (B) Massa corpórea ao longo do experimento dos machos de camundongos da linhagem C57Bl/6J expostos ou não à água contaminada nas concentrações Mix 1x, Mix 10x e Mix 25x. As barras indicam a média \pm desvio padrão dos dados originais. Em “A” os dados de massa relativa do fígado foram submetidos *one-way* ANOVA, a 5 % de probabilidade. Já os dados de massa relativa do cérebro, rins e baço foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis a 5% de probabilidade. Em “B” os dados da massa corpórea dos animais ao longo do experimento foram submetidos ao teste *one-way* ANOVA.

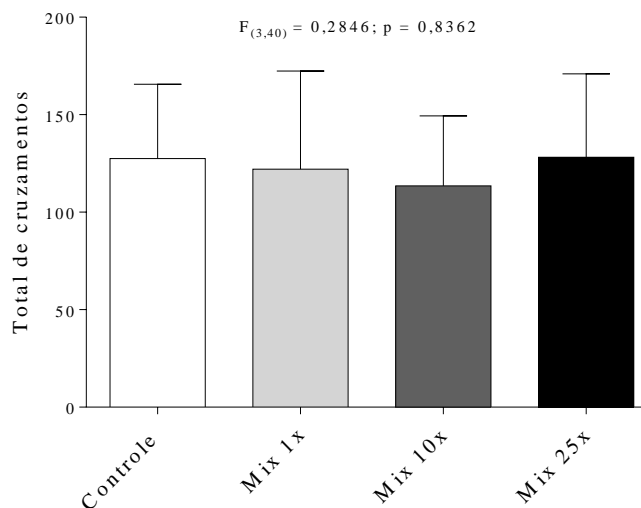
3.3. Comportamento dos animais

Em relação à performance dos animais no teste do campo aberto, a análise estatística mostrou que não houve diferença significativa quanto ao parâmetro “total de cruzamentos”, o que sugere que a locomoção dos animais não foi alterada pelos tratamentos (Figura 13B). Um resultado semelhante foi registrado nos escores do BMS entre os grupos (Figura 13D). Além disso, não observamos efeitos ansiolíticos ou ansiogênicos resultantes dos tratamentos na análise aplicada à locomoção animal nos quadrantes centrais/relação total de locomoção animal, que foi calculada pelo escore de Basso, para cada grupo no teste de campo aberto (Figura 13C). De acordo com Berton & Belzung (1998), as mudanças no estado emocional dos roedores, antes de os animais se exporem a pistas predatórias, podem afetar negativamente sua resposta anti-predatória.

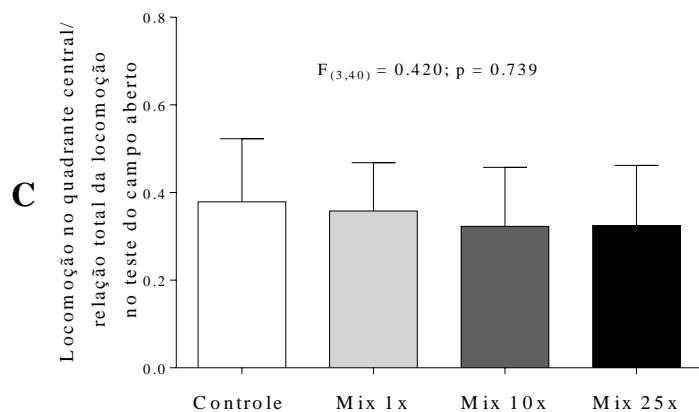
Quanto ao parâmetro “latência para virar contra a fonte luminosa”, avaliado no teste visual, não observamos diferenças significativas entre os grupos controle e tratamentos (Mix 1x, Mix 10x e Mix 25x) (Figura 14C). No teste olfatório, observamos efeito apenas do fator “estímulo” (Figura 14D), havendo diferença significativa na exploração dos papéis com e sem óleo de citronela, em que todos os animais gastaram menos tempo explorando o papel que continha óleo de citronela em relação ao contendo água destilada, porém essa exploração não diferiu estatisticamente entre os grupos, portanto os camundongos reconheceram o óleo de citronela como um repelente como já relatado no estudo de Singla & Kaur (2014).



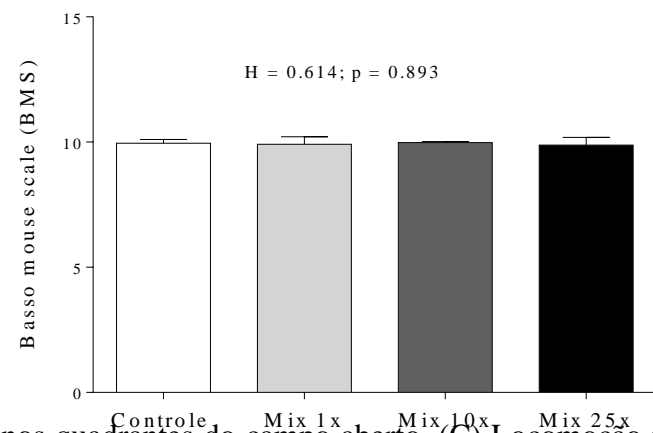
A



B



C



D

Figura 13. (A) Imagem representativa do teste do campo aberto, (B) total de cruzamentos nos quadrantes do campo aberto, (C) Locomoção no quadrante central/relação total da locomoção no teste do campo aberto e (D) Obteve notas médias para a Escala de Basso Mouse para locomoção. As barras indicam a média \pm desvio padrão dos dados. Em “B e C” os dados foram submetidos à one-way ANOVA e em “D” os dados foram ao teste de Kruskal-Wallis, ambos a 5% de probabilidade.

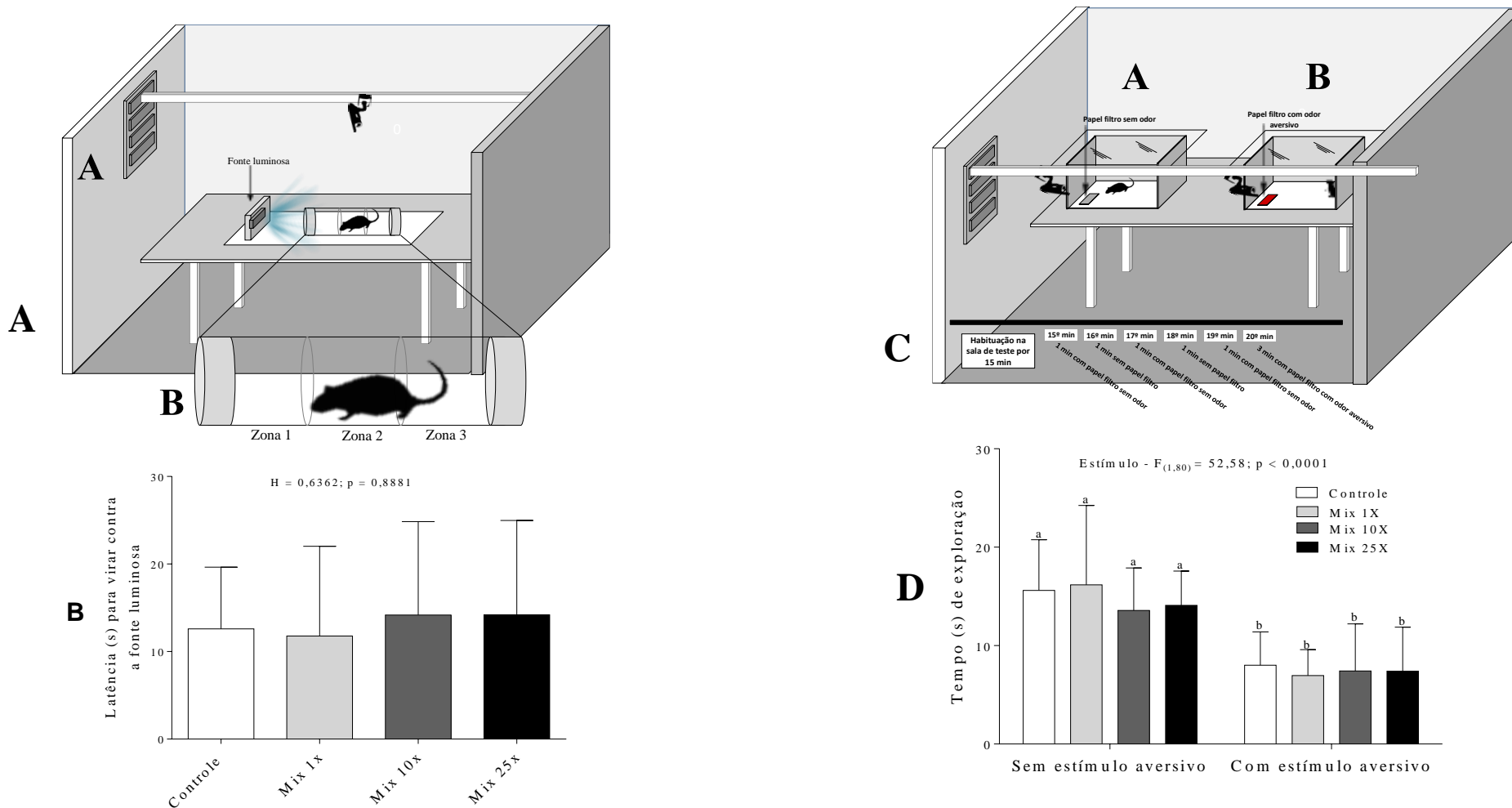


Figura 14. (A) Imagem representativa do teste de locomoção induzida por fonte luminosa (teste visual), (B) latência (s) para virar contra a fonte luminosa (teste visual) e (C) Imagem representativa do teste olfatório, (D) tempo (s) de exploração dos papeis com água e óleo de citronela dos machos de camundongos da linhagem C57Bl/6J expostos ou não à água contaminada nas concentrações Mix 1x, Mix 10x e Mix 25x. As barras indicam a média \pm desvio padrão dos dados originais. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas. Em “B” os dados foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis, a 5% de probabilidade e em “D” os dados foram submetidos a two-way ANOVA com pós-teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Finalizando os testes que antecederam os testes de resposta a potenciais predadores foi realizado o teste auditivo. Nossos resultados revelaram efeito apenas do fator “estímulo” (ruído aversivo) (Figura 15) sobre a exploração/ambulação dos animais, frequência de *freezing* e tempo de *self-grooming*. De acordo com as análises estatísticas houve diferença significativa nos comportamentos dos camundongos na presença e ausência do ruído aversivo quando analisado o comportamento espacial “total de cruzamento” (Figura 15A), observado maior exploração na arena do aparato, assim como maior “frequência de *freezing*” (Figura 15B) e menor “tempo de *self-grooming*” (Figura 15C).

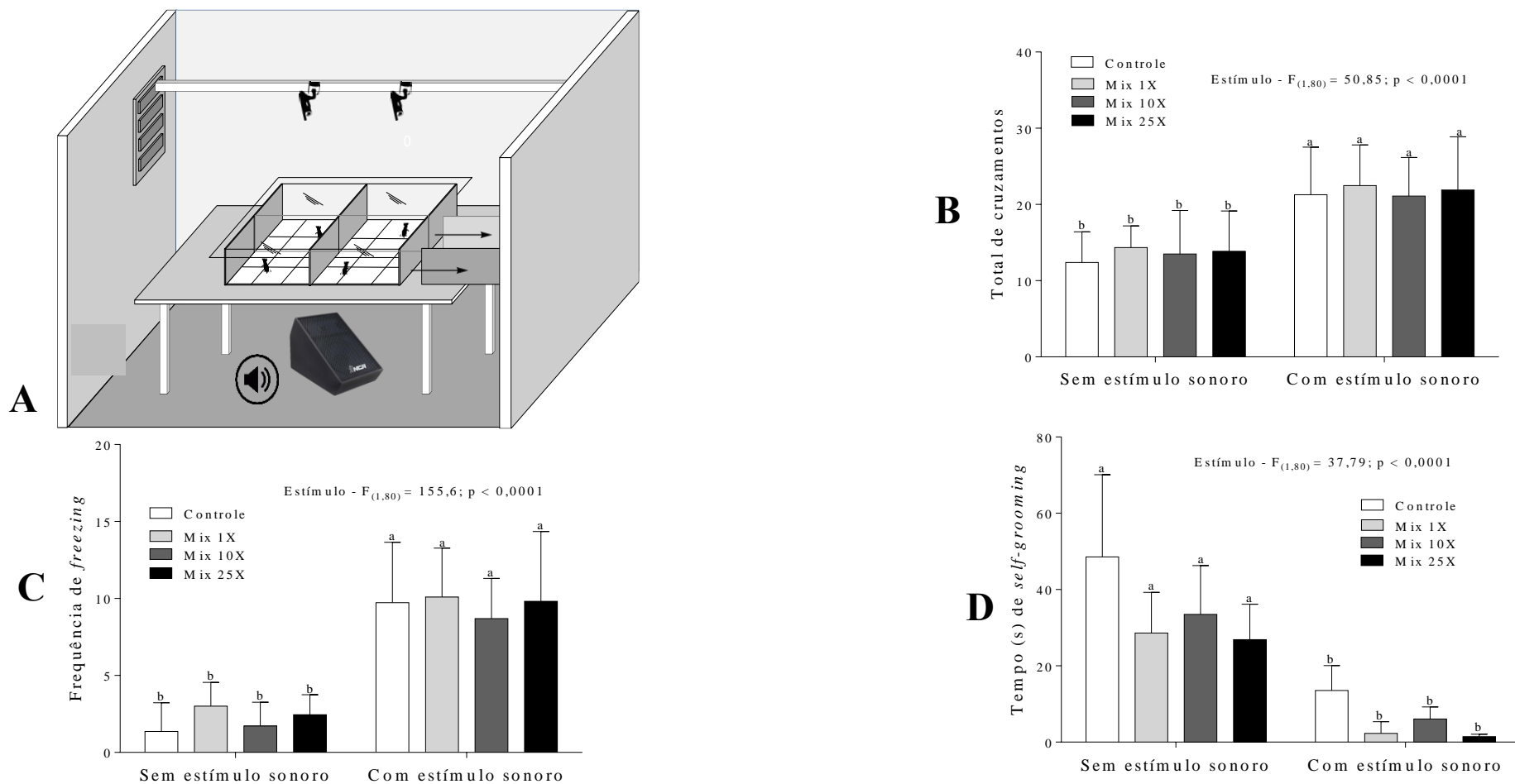


Figura 15. (A) Imagem representativa do teste auditivo, (B) total de cruzamentos na arena do aparato do teste auditivo, (C) frequência de *freezing* e (D) tempo (s) de *self-grooming* de machos de camundongos da linhagem C57Bl/6J expostos ou não à água contaminada nas concentrações Mix 1x, Mix 10x e Mix 25x. As barras indicam a média \pm desvio padrão dos dados originais. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas. Em “B, C e D” os dados foram submetidos a *two-way* ANOVA, com pós-teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Com base nos dados apresentados, observou-se que a ingestão de água contendo o mix de poluentes, não alterou os mecanismos responsáveis pela locomoção, visão, olfato e audição, habilidades cruciais na resposta defensiva (Apfelbach et al., 2005; Takahashi, 2014). Portanto, partindo dos resultados encontrados nesse estudo, podemos supor que essas habilidades não tenham influenciado a resposta defensiva dos camundongos perante os potenciais predadores utilizados nos testes de resposta ao predador.

Assim, após realizados os testes acima citados, os animais foram submetidos aos testes de resposta ao predador, sendo expostos a um potencial predador felino (gato doméstico) e ofídico (cobra-do-milho). Em relação ao teste da resposta ao predador com o estímulo felino, as análises estatísticas revelaram interação entre os fatores “tratamento” e “estímulo” em relação ao comportamento espacial “tempo (s) de permanência na toca” (Figura 16B) (essa toca foi utilizada como um local de possível refúgio desses animais). Observamos que os animais do grupo Mix 25x permaneceram menos tempo na toca em relação aos grupos controle, Mix 1x e Mix 10x, quando na presença do gato.

No parâmetro “tempo (s) de *freezing* em relação ao tempo de permanência do animal fora da toca”, também foi observado a interação entre os fatores “tratamento” e “estímulo”. Observamos que os animais do grupo controle exibiram por maior tempo o comportamento de *freezing* na presença do gato, diferente estatisticamente dos grupos Mix (Figura 16C). O comportamento de *freezing* é uma resposta defensiva comportamental estratégica realizado por presas de diferentes espécies de mamíferos quando se sentem ameaçadas, esse comportamento diminui a possibilidade de ataque do predador a essas presas (Edut & Eilam, 2004; Rabi et al., 2017). Desse modo, a ingestão de água contendo uma mix de poluentes pelos animais causou uma redução do tempo de *freezing* na presença do predador, sugerindo um aumento da susceptibilidade à predação por felinos.

Quanto ao parâmetro “tempo (s) de *self-grooming* em relação ao tempo de permanência do animal fora da toca” foi observado o efeito da interação entre os fatores “tratamento” e “estímulo” em que apenas os animais do grupo controle apresentaram o tempo de *self-grooming* na presença do gato. Nos animais dos grupos Mix 1x, Mix 10x e Mix 25x o tempo de exibição desse comportamento não diferiu significativamente na ausência ou presença do gato (Figura 16D), assim como Staples et al. (2008) observaram que ratos expostos a odor de gato apresentaram um menor tempo de exibição do comportamento de *self-grooming*. O *self-grooming* não é um comportamento defensivo nos roedores (McGregor et al., 2002) porém, está

relacionado com estresse e medo, sendo exibido em maior duração quando o animal apresenta baixos níveis de estresse (Kalueff & Tuohimaa, 2005).

Ao considerarmos que o aumento de *freezing* e a diminuição da *self-grooming* constituem biomarcadores comportamentais sensíveis de estresse e relacionados ao medo (Blanchard & Blanchard, 1988; Graef, 1994; Kalueff & Tuohimaa, 2005), nossos dados sugerem que a capacidade dos animais de reconhecerem o gato como um potencial predador foi influenciada pela ingestão de água contendo diversos poluentes. Os parâmetros para avaliar a bioacumulação do mix de poluentes no sangue dos animais expostos foram os elementos Cr e Mg (Figura 17A-B) além de constituir um indício de que os contaminantes ingeridos tenham sido absorvidos, reforça a hipótese do mix ter influenciado na exibição da resposta defensiva dos animais. Estatisticamente, nossas análises revelaram a existência de correlação significativa entre as variáveis “tempo de exibição do comportamento de *freezing*” vs. concentração de Cr ($r = -0.5018$; $p = 0.0034$) e vs. a concentração de Mg no sangue ($r = -0.362$; $p = 0.041$); bem como “tempo de exibição do comportamento de *self-grooming*” vs. concentração de Cr ($r = -0.424$; $p = 0.015$) e vs. a concentração de Mg no sangue ($r = -0.568$; $p = 0.0007$), o que também reforça nosso argumento. Por outro lado, quando os animais foram submetidos ao teste de resposta ao predador ofídico, não observamos diferenças entre o tempo de permanência na toca (Figura 18A), de exibição do comportamento de *freezing* (Figura 18B) e de *self-grooming* (Figura 18D) registrados nas distintas sessões do teste.

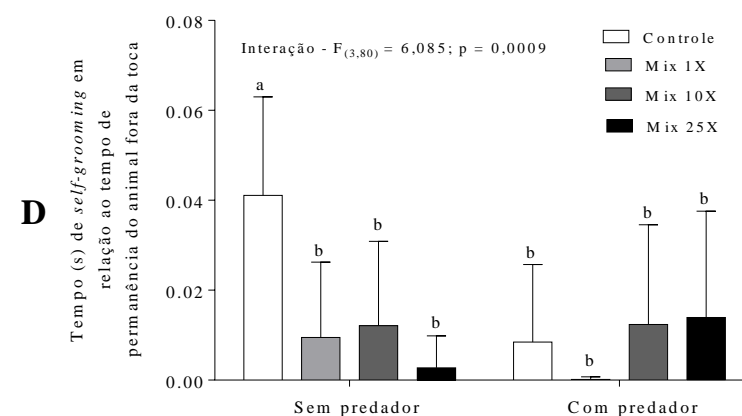
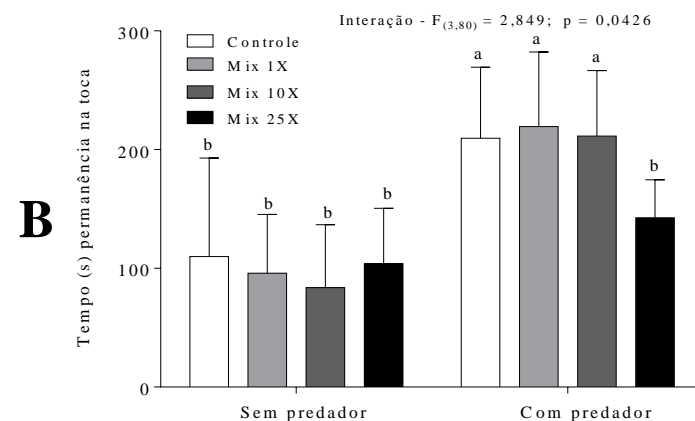
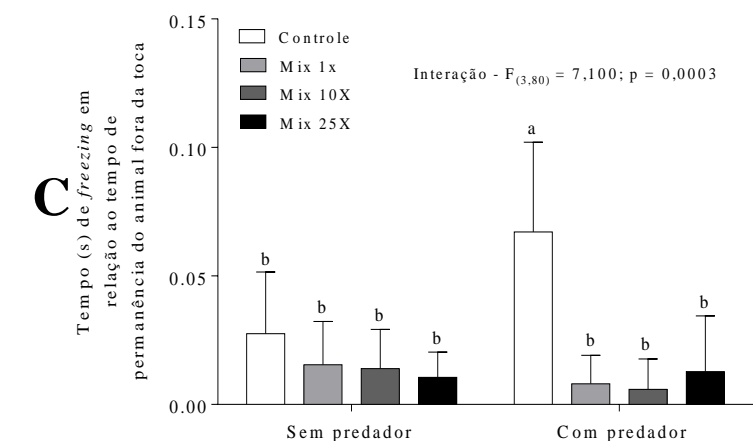
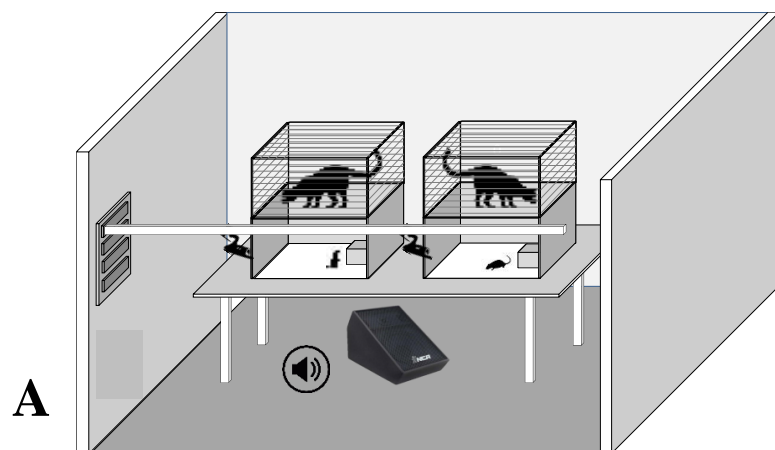


Figura 16. (A) Imagem representativa do teste de resposta ao predador felino, (B) tempo (s) de permanência na toca, (C) tempo (s) de *freezing* em relação ao tempo de permanência do animal fora da toca, e (D) tempo (s) de *self-grooming* em relação ao tempo de permanência do animal fora da toca de exploração dos machos de camundongos da linhagem C57Bl/6J expostos ou não à água contaminada nas concentrações Mix 1x, Mix 10x e Mix 25x. As barras indicam a média \pm desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas. Todos dados foram submetidos a *two-way* ANOVA, com post hoc de Tukey a 5% de probabilidade.

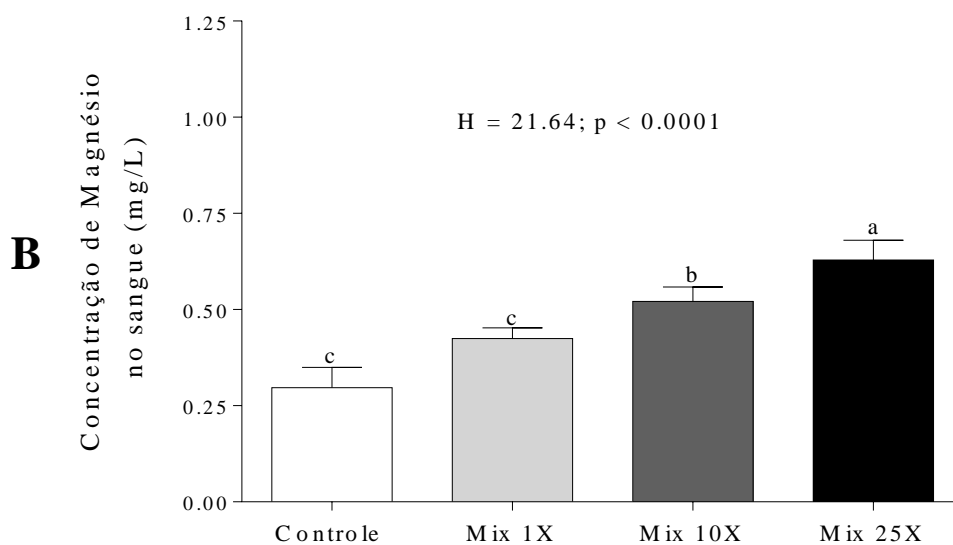
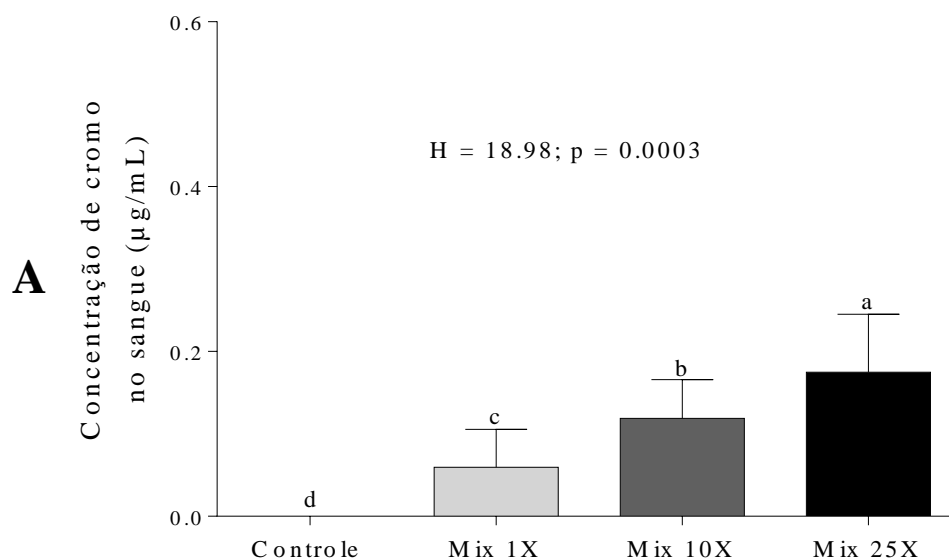


Figura 17. Concentrações de cromo (A) e magnésio (B) no sangue de machos de camundongos C57Bl/6J expostos ou não à ingestão crônica de água contendo um mix de poluentes nas concentrações Mix 1x, Mix 10x e Mix 25x. As barras representam a média \pm desvio padrão dos dados originais, os quais foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis, com teste post hoc de Dunn's, a 5% de probabilidade. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas.

Portanto, os dados acima demonstraram que os animais tratados com água contaminada com o mix de poluentes, teve sua resposta defensiva comportamental afetada, avaliada quando esses animais foram submetidos a presença de um potencial predador. Esses dados corroboram os estudos que utilizam o odor ou a presença de gatos como predadores e observaram um estado de estresse e medo e, respostas defensivas em pequenos roedores (Fendt et al., 2005; Yin et al., 2011; Chen et al., 2014; De-Oliveira et al., 2015, Mendes et al., 2017, Yin et al., 2017).

Essas respostas defensivas frente a ameaças naturais (e.g.: potenciais predadores) têm base nos mecanismos neurais que forma o complexo sistema hipotálamo de defesa interligado localizado na zona medial hipotalâmica contituído pelo núcleo hipotalâmico anterior (AHN), porção dorsoventral do núcleo ventromedial (VmHdm), núcleo pré-mamilar dorsal (PMd) (o qual está totalmente ligado ao comportamento defensivo) (De-Oliveira Crisanto et al., 2015). Animais expostos a odor de gato, apresenta um elevado nível de uma proteína *fos* na região medial hipotalâmica, a qual tem sido utilizada como biomarcadora da atividade neural das reações de medo (Staples et al., 2008; Yin et al., 2017). Portanto, presas em contato indireto, via pistas olfativas, com um potencial predador tem a expressão de proteína *fos* alterada, uma vez que, a elevada atividade neural será desencadeada por um estímulo aversivo tendo como resposta o comportamento defensivo, assim, alterações no sistema hipotálamo de defesa influencia a resposta defensiva dos animais e como já citado no texto, essa resposta é essencial a sobrevivência das presas.

Partindo do exposto, o déficit na resposta defensiva dos camundongos na presença gato, nesse estudo, pode ter sido ocasionada pela alteração na região medial hipotalâmica. Embora não tenha sido realizada análise de imunorreatividade da proteína *fos*, estudos que a fizeram, obtiveram resultados semelhantes quando a resposta defensiva comportamental na presença do gato foi avaliada (Canteras et al., 2008; Staples et al., 2008; De-Oliveira et al., 2015), o que reforça a hipótese do presente trabalho uma vez que, na análise do mix de poluentes utilizado nesse estudo, foi detectado diversas substâncias químicas (Tabelas 2 e 3), as quais já se tem o conhecimento do seu efeito nocivo ao sistema nervoso central, alterando o comportamento dos animais expostos.

Diferente dos dados observados acima em relação a presença do predador felino, a análise estatística revelou que a resposta defensiva comportamental dos animais frente ao potencial predador ofídico não diferenciou significativamente entre os grupos controle e Mix (Mix 1x, Mix 10x e Mix 25x) em nenhum dos parâmetros analisados (Figura 18). A saber: “tempo de permanência na toca” (Figura 18B), “tempo de *freezing* em relação ao tempo de

permanência fora da toca” (Figura 18C) e “tempo de *self-grooming* em relação ao tempo de permanência fora da toca” (Figura 18D). Logo, a exibição dos comportamentos avaliados não aumentou e nem diminuiu na presença do predador ofídico.

A partir dos dados obtidos, a não exibição de comportamentos defensivos frente a serpente não foi um efeito do tratamento, uma vez que o grupo controle também não respondeu a serpente como potencial predador. Embora o objetivo, hipótese e métodos sejam diferentes, resultados semelhantes foram observados em outros estudos que avaliaram resposta defensiva comportamental de roedores frente ao estímulo ofídico. No estudo de Weldon et al. (1987), machos e fêmeas de ratos linhagem Sprague Dawley foram expostos a papeis sem odor (água) e com odor de pele de (esse papeis ficaram previamente no recinto onde as serpentes permaneceram por 36 h) duas espécies de serpentes *Virginia striatula* (se alimenta de minhocas) e *Elaphe obsoleta* (se alimenta de ratos), por 10 min. Os autores observaram que as fêmeas depositaram mais bolos fecais quando exploraram a pele com odor da serpente *E. obsoleta* do que os machos. Porém, não houve diferenças significativas nos comportamentos de ambulação entre o sexo ou entre os tratamentos. Logo, Weldon et al. (1987) concluíram que os camundongos machos podem não detectar o odor da serpente ou se detectarem, podem não reconhecer o estímulo como potencial ameaça predatória.

Já no estudo de DeOliveira et al. (2015), machos de camundongos Swiss foram expostos a odor – pelo – de gato (*Felis catus*) e a odor - maravalha do recinto que as cobras permaneceram por 5 dias – de serpente (*Boa constrictor*). Após a exposição, foi realizada análise de respostas defensivas comportamentais e a expressão da proteína *Fos* (considerada uma biomarcada da atividade neural do sistema nervoso central) Os autores observaram, de acordo com as análises estatísticas, que houve menor expressão da proteína *Fos* e menor repertório de comportamentos defensivos nos animais expostos a odor da serpente em relação aos animais expostos ao odor de gato. Portanto, é muito provável que os animais avaliados (incluindo aqueles do grupo controle) não tenham identificado a cobra como uma ameaça predatória, sendo que os estímulos desse potencial predador (visual, olfatório e auditivo) podem não ter sido suficientes para a percepção do risco e, conseqüentemente, ativação das áreas envolvidas com o medo.

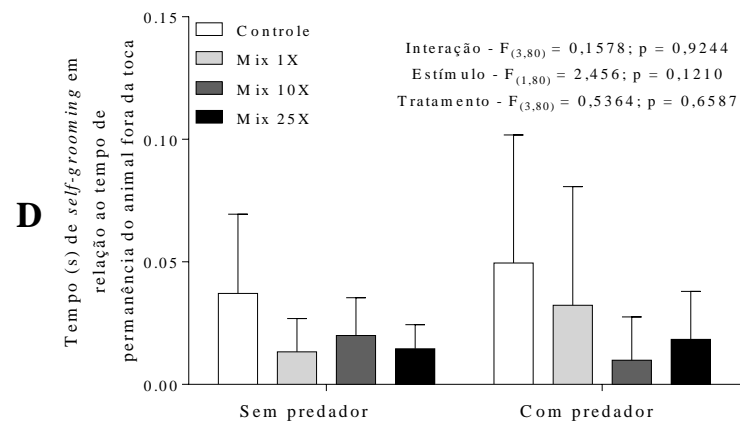
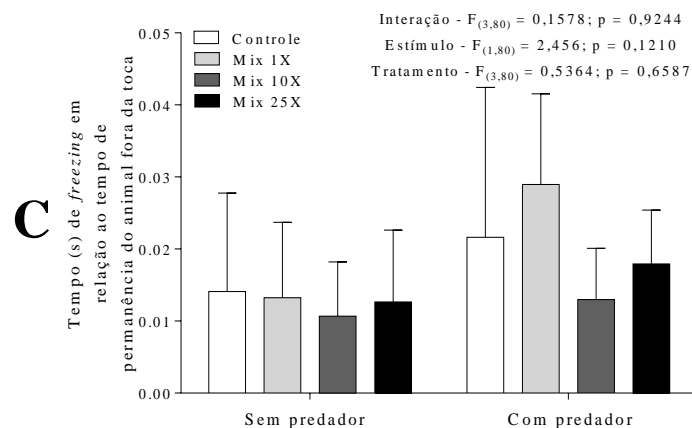
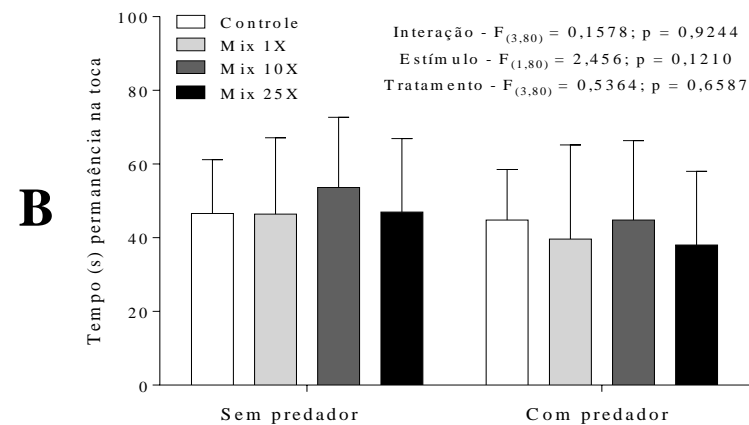
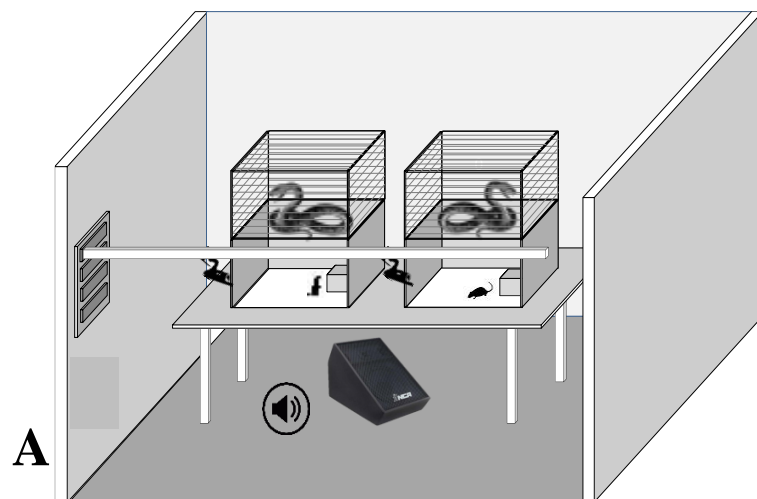


Figura 18. (A) Imagem representativa do teste de resposta ao predador ofídico, (B) Tempo de permanência na toca, (C) tempo de congelamento em relação ao tempo de permanência fora da toca, (D) tempo de *self-grooming* em relação ao tempo de permanência fora da toca dos machos de camundongos da linhagem C57Bl/6J expostos ou não à água contaminada nas concentrações Mix 1x, Mix 10x e Mix 25x. As barras indicam a média \pm desvio padrão dos dados originais. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas. Todos dados foram submetidos a *two-way* ANOVA, com pós-teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

4. CONCLUSÃO

Por fim, podemos concluir que machos de camundongos C57Bl/6J que venham a ingerir água contaminada com um mix de poluentes – mesmo em baixas concentrações (ditas como concentrações ambientais) – tem mecanismos neurais afetados, relacionados especificamente com sua resposta defensiva frente ao potencial predador felino. Uma vez que os mecanismos do reconhecimento de um potencial predador estejam alterados, a sobrevivência do animal e de sua espécie, que ingerem essa água, pode ser comprometida.

Embora haja uma grande preocupação com os impactos que os poluentes podem causar nos sistemas aquáticos e conseqüentemente nos animais que fazem uso deste recurso natural, esta tem sido relacionada a altas concentrações desses poluentes. Nosso trabalho aponta que as baixas concentrações em águas superficiais precisam, também, serem alvos de preocupação, pois o mix desses compostos podem alterar sistemas neuronais dos animais que a ingerem essas águas podendo, assim, implicar em um potencial desequilíbrio no ecossistema.

5. INFORMAÇÃO COMPLEMENTAR

Esse trabalho foi publicado na Science of the Total Environment (estrato A1 no Qualis-CAPES e de fator de impacto 4,900). A versão na íntegra do referido artigo é apresentada no anexo I.

6. REFERÊNCIAS

Abreu MS, Giacomini, ACV, Gusso D, Rosa JG, Koakoski, G, Kalichak, F, Idalêncio R, Oliveira TA, Barcellos HHA, Bonan CD, Barcellos LJ. Acute exposure to waterborne psychoactive drugs attract zebrafish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 179: 37-43, 2016.

American Public Health Association (APHA). Standard methods for the examination of water and wastewater. New York: APHA, AWWA, WPCR. 20: 1194, 1997.

Apfelbach R, Blanchard CD, Blanchard RJ, Hayes RA, McGregor IS. The effects of predator odors in mammalian prey species: a review of field and laboratory studies. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 29(8):1123-1144, 2005.

Bai, SH, Ogbourne, S. Eco-toxicological effects of the avermectin family with a focus on abamectin and ivermectin. *Chemosphere*, 154: 204-214, 2016.

- Bai, SH, Ogbourne, SM. Glyphosate: environmental contamination, toxicity and potential risks to human health via food contamination. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(19): 18988-19001, 2016.
- Barata-Silva C, Mitri, S, Pavesi T, Saggiaro, E, Costa JM. Benzeno: reflexos sobre a saúde pública, presença ambiental e indicadores biológicos utilizados para a determinação da exposição. *Cadernos Saúde Coletiva*, 22(4): 329-342, 2004.
- Barry MJ. Fluoxetine inhibits predator avoidance behavior in tadpoles. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 96(4): 641-649, 2014.
- Basso DM, Fisher LC, Anderson AJ, Jakeman LB, McTigue DM, Popovich PG. Basso Mouse Scale for locomotion detects differences in recovery after spinal cord injury in five common mouse strains. *Journal Neurotrauma* 23: 635-659, 2006.
- Becker AM, Gerstmann S, Frank. Perfluorooctane surfactants in waste waters, the major source of river pollution. *Chemosphere*, 72(1): 115-121, 2008.
- Benbrook, CM. Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. *Environmental Sciences Europe*, 28(1): 3, 2016.
- Berton F, Vogel E, Belzung C. Modulation of mice anxiety in response to cat odor as a consequence of predators diet. *Physiology Behavior*, 65(2):247-54 1998.
- Blanchard DC, Blanchard RJ. Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. *Annual review of psychology*, 39 (1): 43-68, 1998.
- Boxall ABA. The environmental side effects of medication. *EMBO reports*, 5 (12): 1110-1116, 2004.
- Brandão FP, Rodrigues S, Castro BB, Goncalves F, Antunes SC, Nunes B. Short-term effects of neuroactive pharmaceutical drugs on a fish species: biochemical and behavioural effects. *Aquatic toxicology*, 144: 218-229, 2013.
- Brasil. Portaria N°. 518, de 25 de Março de 2004. Norma de qualidade de água para consumo humano. Ministério da Saúde.
- Canteras NS, Kroon JA, Do-Monte FH, Pavesi E, Carobrez AP. Sensing danger through the olfactory system: the role of the hypothalamic dorsal premammillary nucleus. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 32(7): 1228-1235, 2008.

- Carola V, D'Olimpio F, Brunamonti E, Mangia F, Renzi P. Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behaviour in inbred mice. *Behavioural Brain Research*, 134: 49-57, 2002.
- Chen LJ, Shen BQ, Liu DD, Li ST. The effects of early-life predator stress on anxiety-and depression-like behaviors of adult rats. *Neural plasticity*, 2014.
- Chiavola A, Pierpaolo T, Boni, MR. Fate of selected drugs in the wastewater treatment plants (WWTPs) for domestic sewage. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-11, 2017.
- China CR, Ndaro MS. A study on leather sector investment status in Tanzania. *African Journal of Science and Research*, 4 (6): 19-22, 2015.
- Cleuvers M. Mixture toxicity of the anti-inflammatory drugs diclofenac, ibuprofen, naproxen, and acetylsalicylic acid. *Ecotoxicology and environmental safety*, 59(3): 309-315, 2004.
- Collares-Pereira MJ, Cowx IG. The role of catchment scale environmental management in freshwater fish conservation. *Fish. Manag. Ecol.* 11(3-4):, 303-312, 2004.
- Costa RN, Nomura F. Measuring the impacts of Roundup Original® on fluctuating asymmetry and mortality in a Neotropical tadpole. *Hydrobiologia*, 765(1): 85-96, 2016.
- Daughton CG, Ruhoy IS. Environmental footprint of pharmaceuticals: the significance of factors beyond direct excretion to sewers. *Environmental toxicology and chemistry*, 28(12): , 2495-2521, 2009.
- Deblonde T, Cossu-Leguille C, & Hartemann P. Emerging pollutants in wastewater: a review of the literature. *International journal of hygiene and environmental health*, 214(6):, 442-448, 2011.
- De-Oliveira Crisanto K, de Andrade WM, de Azevedo Silva KD, Lima RH, de Oliveira Costa MS, de Souza Cavalcante J, de Lima RR, do Nascimento ES Jr, Cavalcante JC. The differential mice response to cat and snake odor. *Physiology Behavior*, 152 (1): 272-279. 2015.
- Edut S, & Eilam, D. Protean behavior under barn-owl attack: voles alternate between freezing and fleeing and spiny mice flee in alternating patterns. *Behavioural Brain Research*, 155(2): 207-216, 2004.
- Elizalde-Velázquez A, Martínez-Rodríguez H, Galar-Martínez M, Dublán-García O, Islas-Flores H, Rodríguez-Flores JJ, Gómez-Oliván LM. Effect of amoxicillin exposure on brain,

gill, liver, and kidney of common carp (*Cyprinus carpio*): The role of amoxicilloic acid. *Environmental Toxicology*, 32(4):1102-1120., 2017.

Emmerson M, Morales MB, Oñate JJ, Batáry P, Berendse F, Liira J Pärt, T. Chapter Two-How Agricultural Intensification Affects Biodiversity and Ecosystem Services. *Advances in Ecological Research*, 55: 43-97, 2016.

Estrela DC, Guimarães, ATB, Lemes, CGC, Malafaia G. Short-term malnutrition in Wistar rats. *Scientia Plena*, 10(7): 1-13, 2014.

Estrela FN, Rabelo LM, Vaz B. G, de Oliveira Costa DR, Pereira I, de Lima Rodrigues AS, Malafaia G. Short-term social memory deficits in adult female mice exposed to tannery effluent and possible mechanism of action. *Chemosphere*. 2017.

Evans S, Bagnall J, Kasprzyk-Hordern B. Enantiomeric profiling of a chemically diverse mixture of chiral pharmaceuticals in urban water. *Environmental Pollution*, 230: 368-377, 2017.

Fendt M, Endres T, Lowry CA, Apfelbach, R, McGregor IS. TMT-induced autonomic and behavioral changes and the neural basis of its processing. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 29(8):1145-1156, 2005.

Flippin JL, Huggett D, Foran, CN. Changes in the timing of reproduction following chronic exposure to ibuprofen in Japanese medaka, *Oryzias latipes*. *Aquatic Toxicology*, 81 (1):73-78, 2007.

Flurkey K, Curren JM, Harrison DE. The Mouse in Aging Research. In *The Mouse in Biomedical Research* 2nd Edition. Fox JG, et al, editors. American College Laboratory Animal Medicine (Elsevier), 637–672, 2007.

Foley JA, Navin Ramankutty, Kate A, Brauman ES, Cassidy JS, Gerber MJ, Nathaniel D. Mueller, Deepak K. Ray, West Paul C. West, Balzer Christian Balzer, Elena M. Bennett, EM Stephen R.C Carpenter, Jason Hill, Chad Monfreda, Stephen Polasky, Johan Rockström, John Sheehan, Stefan Siebert, David Tilman & David P. M. Zaks . Solutions for a cultivated planet. *Nature* 47: 337–342, 2011.

Foran CM, Weston J, Slattery M, Brooks BW, Huggett DB. Reproductive assessment of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) following a four-week fluoxetine (SSRI) exposure. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 46(4): 511-517, 2004.

- Franklin O, Cambui CA, Gruffman L, Palmroth S, Oren R, Näsholm T. The carbon bonus of organic nitrogen enhances nitrogen use efficiency of plants. *Plant, Cell & Environment*, 40(1): 25-35, 2017.
- Frings H, Frings M, Kivert A. Behavior patterns of the laboratory mouse under auditory stress. *Journal of Mammalogy*, 32(1): 60-76, 1951.
- Gafny S, Goren M, Gasith A. Habitat condition and fish assemblage structure in a coastal mediterranean stream (Yarqon, Israel) receiving domestic effluent. *Hydrobiologia*, 422: 319-330, 2000.
- Ghali K, Leuenberger J, Ansermet M, Perrin N, Dufresnes C. Toxic effects of estradiol E2 on development in the European tree frog (*Hyla arborea*). *Herpetology Notes*, 9: 249-253, 2016.
- Guimarães ATB, Ferreira RO, Silva WAM, Castro ALS, Malafaia G. Parental exposure to tannery effluent cause anxiety-and depression-like behavior in mice offspring. *JSM Anxiety and Depression*, 1: 1005, 2016.
- Hoeger BA, Köllner B, Dietrich DR, Hitzfeld B. Water-borne diclofenac affects kidney and gill integrity and selected immune parameters in brown trout (*Salmo trutta f. fario*). *Aquatic Toxicology*, 75 (1): 53-64, 2005.
- Hu J, Xiao Z, Zhou R, Deng W, Wang, Ma S. Ecological utilization of leather tannery waste with circular economy model. *Journal of Cleaner Production*, 19: 221-228, 2011.
- Johnson J, Wu V, Donovan M, Majumdar S, Rentería RC, Porco T, Copenhagen, DR. Melanopsin-dependent light avoidance in neonatal mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107 (40): 17374-17378, 2010.
- Kalueff AV, Tuohimaa P. The grooming analysis algorithm discriminates between different levels of anxiety in rats: potential utility for neurobehavioural stress research. *Journal of Neuroscience Methods*, 143(2): 169-177, 2005.
- Kiba T, Krapp, A. Plant nitrogen acquisition under low availability: regulation of uptake and root architecture. *Plant and Cell Physiology*, 57(4): 707-714, 2016.
- Kibuule D, Mubita M, Naikaku E, Kalemeera F, Godman BB, Sagwa E. An analysis of policies for cotrimoxazole, amoxicillin and azithromycin use in Namibia's public sector: Findings and therapeutic implications. *International journal of clinical practice*, 71 (2): 1-10, 2017.

Kobayakawa K, Kobayakawa R, Matsumoto H, Oka Y, Imai T, Ikawa M, Okabe M, Ikeda T, Itohara S, Kikusu T, Mori K, Sakano H. Innate versus learned odour processing in the mouse olfactory bulb. *Nature*, 450 (7169): 503-508, 2007.

Lasota JA, Dybas RA. Abamectin as a pesticide for agricultural use. *Acta Leidensia*, 59(1-2): 217-225, 1989.

Leghari SJ, Wahocho NA, Laghari GM, HafeezLaghari A, Mustafa Bhabhan G, Hussain Talpur K, Bhutto TA, Wahocho AS, Lashari AA. Role of nitrogen for plant growth and development: a review. *Advances in Environmental Biology*, 10(9): 209-219.

Lemos CT, Erdtmann, B. Cytogenetic evaluation of aquatic genotoxicity in human cultured lymphocytes. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 467(1): 1-9, 2000.

Li CH, Shen CC, Cheng YW, Huang SH, Wu CC, Kao CC, Liao JW, Kang JJ. Organ biodistribution, clearance and genotoxicity of orally administered zinc oxide nanoparticles in mice. *Nanotoxicology*, 6(7): 746-756, 2012.

Lindim, C, Van Gils J, Georgieva D, Mekenyan O, Cousins IT. Evaluation of human pharmaceutical emissions and concentrations in Swedish river basins. *Science of the Total Environment*, 572, 508-519, 2016.

Louw-du Toit, R, Perkins, MS, Hapgood JP, Africander D. Comparing the androgenic and estrogenic properties of progestins used in contraception and hormone therapy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 491 (1): 140-146, 2017.

Lu C, Tian H. Global nitrogen and phosphorus fertilizer use for agriculture production in the past half century: shifted hot spots and nutrient imbalance. *Earth System Science Data*, 9(1): 181 – 192, 2017.

Macé E, Caplette R, Marre O, Sengupta A, Chaffiol A, Barbe P, Desrosiers M, Bamberg E, Sahel JA, Picaud S, Duebel J, Dalkara D. Targeting channelrhodopsin-2 to ON-bipolar cells with vitreally administered AAV Restores ON and OFF visual responses in blind mice. *Molecular Therapy*, 23 (1): 7-16, 2015.

Malafaia G, Estrela DC, Silva WAM, Guimarães ATB, Mendes BO, Rodrigues ASL, Menezes IPP. Toxicity study in mice fed with corn produced in soil containing tannery sludge vermicompost and irrigated with domestic wastewater. *Current Science*, 109(7): 1326-1332, 2015.

- McGregor IS, Schrama L, Ambermoon P, Dielenberg RA. Not all ‘predator odours’ are equal: cat odour but not 2, 4, 5 trimethylthiazoline (TMT; fox odour) elicits specific defensive behaviours in rats. *Behavioural Brain Research*, 129(1): 1-16, 2002.
- Mendes OB, Rabelo LM, Silva BC, Souza JM, Castro ALS, Silva AR, Rodrigues ASL, Malafaia, G. Mice exposure to tannery effluents changes their olfactory capacity, and their response to predators and to the inhibitory avoidance test. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(23): 19234-19248, 2017.
- Montalvão MF, de Souza JM, Guimarães ATB, de Menezes IPP, da Silva Castro AL, de Lima Rodrigues AS, Malafaia G. The genotoxicity and cytotoxicity of tannery effluent in bullfrog (*Lithobates catesbeianus*). *Chemosphere*, 183: 491-502, 2017.
- Mortatti J, Vendramini D, De Oliveira H. Avaliação da poluição doméstica fluvial na zona urbana do município de Piracicaba, SP, Brasil. *Ambiente & Água - An Interdisciplinary Journal of Applied Science*, 7 (2): 110-119, 2012.
- Noorhosseini SA, Allahyari MS, Damalas CA, Moghaddam SS. Public environmental awareness of water pollution from urban growth: The case of Zarjub and Goharrud rivers in Rasht, Iran. *The Science of the total environment*, 599-600: 2019-2025, 2017.
- Novelli A, Vieira BH, Braun AS, Mendes LB, Daam MA, Espíndola ELG. Impact of runoff water from an experimental agricultural field applied with Vertimec® 18EC (abamectin) on the survival, growth and gill morphology of zebrafish juveniles. *Chemosphere*, 144, 1408-1414, 2016.
- Oliveira BM., Rabelo LM, Silva BC, Souza JM, Castro, ALS, Silva AR, Rodrigues ASL, Malafaia, G. Mice exposure to tannery effluents changes their olfactory capacity, and their response to predators and to the inhibitory avoidance test. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-15, 2017.
- Paez-Osuna F, Alvarez-Borrego S, Ruiz-Fernández AC, Garcia-Hernandez J, Jara-Marini M, Bergés-Tiznado, Ruelas-Inzunza, JR. Environmental status of the Gulf of California: A pollution review. *Earth-Science Reviews*, 166: 181-205, 2017.
- Pal A, Gin KYH, Lin AYC, Reinhard M. Impacts of emerging organic contaminants on freshwater resources: review of recent occurrences, sources, fate and effects. *Science of the Total Environment*, 408(24): 6062-6069, 2010.

- Pamplona JH, Oba ET, Da Silva TA, Ramos LP, Ramsdorf WA, Cestari MM, de Assis, HS. Subchronic effects of dipyrone on the fish species *Rhamdia quelen*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 74(3), 342-349, 2011.
- Papes F, Logan, DW Stowers L. The vomeronasal organ mediates interspecies defensive behaviors through detection of protein pheromone homologs. *Cell*, 141 (4): 692-703, 2010.
- Perez-Gonzalez, E, Osuna-Martinez UG, Herrera-Moreno, MN, Rodriguez-Meza GD, Gonzalez-Ocampo HA, Bucio-Pacheco M. Organochlorine Pesticides in Gonad, Brain, and Blood of Mice in Two Agricultural Areas of Sinaloa. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 98(4): 454-459, 2017.
- Perreault HA, Semsar K, Godwin J. Fluoxetine treatment decreases territorial aggression in a coral reef fish. *Physiology & Behavior*, 79 (4): 719-724, 2003
- Peruzzo, PJ, Porta, AA, Ronco, AE. Levels of glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in north pampasic region of Argentina. *Environmental Pollution*, 156 (1): 61-66, 2008.
- Poiger T, Buerge IJ, Bächli A, Müller MD, Balmer ME. Occurrence of the herbicide glyphosate and its metabolite AMPA in surface waters in Switzerland determined with on-line solid phase extraction LC-MS/MS. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(2): 1588-1596, 2017.
- Polosukhina A, Litt J, Tochitsky I, Nemargut J, Sychev Y, Kouchkovsky I, Huang T, Borges K, Trauner D, Gelder VRN, Kramer RH. Photochemical restoration of visual responses in blind mice. *Neuron*, 75 (2): 271-282, 2012.
- Prut L, Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *European Journal of Pharmacology*, 463: 3-33, 2003.
- Quadra GR, Souza HO, Costa SR, Fernandez MAS. Do pharmaceuticals reach and affect the aquatic ecosystems in Brazil? A critical review of current studies in a developing country. *Environmental Science and Pollution Research*, 24 (2): 1200–1218, 2016.
- Rabelo LM, Silva, BC, Almeida, SF, Silva, WAM, Oliveira MB, Guimarães, ATB, Silva AR, Castro ALS, Rodrigues ASL, Malafaia, G. Memory deficit in Swiss mice exposed to tannery effluent. *Neurotoxicology and teratology*, 55: 45-49, 2016.

- Rabi C, Zadicario P, Mazon Y, Wagner N, Eila, D. The response of social and non-social rodents to owl attack. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 71(9), 131, 2017.
- Rahman S. Pesticide consumption and productivity and the potential of IPM in Bangladesh. *Science of the Total Environment*, 445, 48-56, 2013.
- Rouimi P, Zucchini-Pascal N, Dupont G, Razpotnik A, Fouché E, De Sousa G, Rahmani R. Impacts of low doses of pesticide mixtures on liver cell defence systems. *Toxicology in Vitro*, 26(5), 718-726, 2012.
- Sabumon PC. "Perspectives on biological treatment of tannery effluent", *Advances in Recycling & Waste Management: Open Access*, 1(1): 3-10, 2016.
- Samanta P, Pal S, Mukherjee AK, Senapati T, Ghosh AR. Histopathological and ultrastructural alterations in *Anabas Testudineus* exposed to glyphosate-based herbicide, excel mera 71 under field and laboratory conditions. *Journal Aquaculture Research Development* 7(7): 1-6, 2016.
- Scheibel, JJ. The evolution of anionic surfactant technology to meet the requirements of the laundry detergent industry. *Journal of surfactants and detergents*, 7(4): 319-328, 2004.
- Schwarzenbach RP, Escher BI, Fenner K, Hofstetter TB, Johnson CA, Von Gunten U, Wehrli B. The challenge of micropollutants in aquatic systems. *Science*, 313(5790), 1072-1077, 2006.
- Singla N, Kaur R. Potential of citronella oil as rodent repellent measured as aversion to food. *Applied Biological Research*, 16(2): 191-198, 2014.
- Smith GC, Watson D. Selection patterns of corn snakes, *Elaphe guttata*, of different phenotypes of the house mouse, *Mus musculus*. *Copeia*, 3: 529-532, 1972.
- Sobjak TM, Romão S, do Nascimento CZ, dos Santos AFP, Vogel L, Guimarães ATB. Assessment of the oxidative and neurotoxic effects of glyphosate pesticide on the larvae of *Rhamdia quelen* fish. *Chemosphere*, 182, 267-275, 2017.
- Sodré FF, Locatelli, MA F, Jardim WF. Occurrence of emerging contaminants in Brazilian drinking waters: a sewage-to-tap issue. *Water, Air, & Soil Pollution*, 206 (1): 57-67, 2010
- Soni V, Khwaja S, Visavadia M. Preimpoundmental studies on Water Quality of Narmada River of India. *International Research Journal of Environment Sciences*, 2(6): 31-38, 2013.

Souza JM, da Silva WAM, de Oliveira Mendes B, Batista Guimarães AT, de Almeida SF, Estrela DC, Silva AR, Rodrigues ASL, Malafaia G. Neurobehavioral Evaluation of C57BL/6J Mice Submitted to Tannery Effluents Intake. *JSM Anxiety and Depression* 1: 1006, 2016.

Souza JM, Montalvão MF, da Silva AR, de Lima Rodrigues AS, Malafaia G. A pioneering study on cytotoxicity in Australian parakeets (*Melopsittacus undulates*) exposed to tannery effluent. *Chemosphere*, 175: 521-533, 2017.

Staples LG, McGregor IS, Apfelbach R. Cat odor, but not trimethylthiazoline (fox odor), activates accessory olfactory and defense-related brain regions in rats. *Neuroscience* 151: 937–947, 2008.

StarkeWW, Ferkin MH. Chemical cues from kingsnakes do not cause inducible defenses in house mice. *Current Zoology*, 58(6): 797-804, 2012.

Suthar S, Sharma J, Chabukdhara M, Nema AK. Water quality assessment of river Hindon at Ghaziabad, India: impact of industrial and urban wastewater. *Environmental Monitoring and Assessment*, 165(1): 103-112, 2010.

Takahashi LK. Olfactory systems and neural circuits that modulate predator odor fear. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 8: 1-13, 2014.

Tarazona JV, Tiramani M, Reich H, Pfeil R, Istace F, Crivellente, F. Glyphosate toxicity and carcinogenicity: a review of the scientific basis of the European Union assessment and its differences with IARC. *Archives of Toxicology*, 91(8): 2723-27431, 2017.

Ternes T, Bonerz M, Schmidt T. Determination of neutral pharmaceuticals in wastewater and rivers by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography*, 938(1): 175-185, 2001.

Ternes, TA. Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water research*, 32(11): 3245-3260, 1998.

Trexler ET, Smith-Ryan AE, Norton LE. Metabolic adaptation to weight loss: implications for the athlete. *J Int Soc Sports Nutr.*, 1 (11): 7

Vasconcelos AM, Daam MA, de Resende JC, Casali-Pereira MP, Espíndola EL. Survival and development of bullfrog tadpoles in microcosms treated with abamectin. *Ecotoxicology*, 26 (6): 729-737, 2017.

Veldhoen N, Skirrow RC, Brown LL, Van Aggelen G, Helbing CC. Effects of acute exposure to the non-steroidal anti-inflammatory drug ibuprofen on the developing North American bullfrog (*Rana catesbeiana*) tadpole. *Environmental Science & Technology*, 48(17): 10439-10447, 2014.

Vulliet E, Cren-Olivé C. Screening of pharmaceuticals and hormones at the regional scale, in surface and groundwaters intended to human consumption. *Environmental Pollution*, 159(10), 2929-2934, 2011.

Wade MG, Foster WG, Younglai EV, McMahon A, Leingartner K, Yagminas AL, Hughes CL. Effects of subchronic exposure to a complex mixture of persistent contaminants in male rats: systemic, immune, and reproductive effects. *Toxicological Sciences*, 67(1): 131-143, 2002.

Weichert FG, Floeter C, Artmann ASM, Kammann U. Assessing the ecotoxicity of potentially neurotoxic substances—Evaluation of a behavioural parameter in the embryogenesis of *Danio rerio*. *Chemosphere*, 186: 43-50, 2017.

Weldon PJ, Divita FM, Middendorf GA. Responses to snake odors by laboratory mice. *Behavior Processes*, 14(2): 137-146. 1987.

Welham SJ, Sparrow AJ, Gardner DS, Elmes MJ. Acetylsalicylic acid interferes with embryonic kidney growth and development by a prostaglandin-independent mechanism. *World Journal of Nephrology*, 6(1): 21, 2017.

Xu Z, Zhang X, Xie J, Yaun G, Tang Xinzhai, Sun X, Yu G. Total nitrogen concentrations in surface water of typical agro-and forest ecosystems in China, 2004-2009. *Plos one*, 9 (3): 92850, 2014.

Yadav IC, Devi NL, Syed JH, Cheng Z, Li J, Zhang G, Jones KC. Current status of persistent organic pesticides residues in air, water, and soil, and their possible effect on neighboring countries: a comprehensive review of India. *Science of the Total Environment*, 511, 123-137, 2015.

Yang JD, Abdelmalek MF, Guy CD, Gill RM, Lavine JE, Yates K, Klair J, Terrault NA, Unalp-Arida A, Diehl AM, Suzuki AAyoko. Patient sex, reproductive status, and synthetic hormone use associate with histologic severity of nonalcoholic steatohepatitis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 15(1): 127-131, 2017.

Yin B, Gu C, Lu Y, Hegab IM, Yang S, Wang A, Wei W. Repeated exposure to cat urine induces complex behavioral, hormonal, and c-fos mRNA responses in Norway rats (*Rattus norvegicus*). *The Science of Nature*, 104 (64) : 7-8, 64, 2017.

Yin BF, Fan HM, Li SP, Hegab IM, Lu GY, Wei WH. (2011) Behavioral response of Norway rats (*Rattus norvegicus*) to odors of different mammalian species. *Journal Pest Sci* 84(3): 265–272, 2011.

Zhao F, Wei P, Wang J, Yu M, Zhang X, Tian H, Ru S. Estrogenic effects associated with bisphenol A exposure in male zebrafish (*Danio rerio*) is associated with changes of endogenous 17 β -estradiol and gene specific DNA methylation levels. *General and Comparative Endocrinology*, 2017.

Zorpas AA, Dimitriou, M, Voukkali I. Disposal of household pharmaceuticals in insular communities: social attitude, behaviour evaluation and prevention activities. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-11, 2017.



The intake of water containing a mix of pollutants at environmentally relevant concentrations leads to defensive response deficit in male C57Bl/6J mice



Joyce Moreira de Souza^a, Letícia Martins Rabelo^b, Denise Braga Gomes de Faria^a,
Abraão Tiago Batista Guimarães^a, Wellington Alves Mizael da Silva^a, Thiago Lopes Rocha^c,
Fernanda Neves Estrela^b, Thales Quintão Chagas^b, Bruna de Oliveira Mendes^a, Guilherme Malafaia^{a,b,*}

^a Post-Graduation Program in Conservation of Cerrado Natural Resources, Goiano Federal Institute of Education, Science and Technology, Uruaí Campus, GO, Brazil

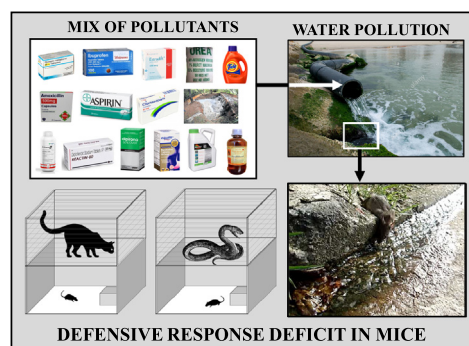
^b Biological Research Laboratory, Goiano Federal Institute, Uruaí Campus, GO, Brazil

^c Laboratory of Environmental Biotechnology and Ecotoxicology, Institute of Tropical Pathology and Public Health, Federal University of Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil

HIGHLIGHTS

- Water containing a mix of pollutants (Mix) leads to behavioral disorders in mouse.
- Defensive response deficit in male mice exposed to water containing a mix of pollutants.
- Mouse that ingested pollutant mix (in the water) did not recognize cat as a potential predator.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 December 2017

Received in revised form 3 February 2018

Accepted 3 February 2018

Available online xxxx

Editor: Henner Hollert

Keywords:

Anti-predatory behavior

Predator

Mixtures of pollutants

ABSTRACT

Previous studies have individually confirmed the toxic effects from different pollutants on mammals. However, effects resulting from the exposure of these animals to multi-pollutant mixes have not been studied so far. Thus, the aim of the current study is to assess the effect from the chronic exposure (105 days) of C57Bl/6J mice to a mix of pollutants on their response to potential predators. In order to do so, the following groups were formed: “control”, “Mix 1× [compounds from 15 pollutants identified in surface waters at environmentally relevant concentration (ERC)]”, “Mix 10×” and “Mix 25×” (concentrations 10 and 25 times higher than the ERC). From the 100th experimental day on, the animals were subjected to tests in order to investigate whether they showed locomotor, visual, olfactory and auditory changes, since these abilities are essential to their anti-predatory behavior. Next, the animals' behavior towards potential predators (*Felis catus* and *Pantherophis guttatus*) was assessed. The herein collected data did not show defensive response from any of the experimental groups to the predatory stimulus provided by *P. guttatus*. However, the control animals, only, presented anti-predatory behavior when *F. catus* was introduced in the apparatus, fact that suggests defensive response deficit

* Corresponding author at: Laboratório de Pesquisas Biológicas, Instituto Federal Goiano, Campus Uruaí, Rodovia Geraldo Silva Nascimento, 2.5 km, Zona Rural, Uruaí, GO 75790-000, Brazil.

E-mail address: guilhermeifgoiano@gmail.com (G. Malafaia).

Complex pollutants
Aquatic pollution

resulting from the treatments. Thus, the current study is pioneer in showing that the chronic intake of water containing a mix of pollutants (even at low concentrations) leads to behavioral disorders able to affect the survival and population dynamics of mammalian species at ecological level.

© 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Agricultural practices that adopt traditional soil preparation techniques, phytosanitary control by means of pesticides, and substantial amounts of chemical fertilizers are anthropogenic activities that, despite their high toxicological potential, play a key role in the supply of human population demands, (Godfray et al., 2010; Foley et al., 2011). Nowadays, nitrogen is one of the fertilizers most applied to different crops, since it is essential to plant nutrition, development and yield (Fageria and Baligar, 2005); however, it can be highly harmful to different organisms if it is indiscriminately used (Carpenter et al., 1998; Deng et al., 2017). In addition, the use of agrochemicals has considerably increased in recent years (Ecobichon, 2001; Tilman et al., 2002); glyphosate (Woodburn, 2000; Duke and Powles, 2008) and abamectin (Lasota and Dybas, 1990; Bai and Ogbourne, 2016), which may affect non-target organisms and have harmful effects on biological communities, stand out among the most used agrochemicals in the world. If, on the one hand, these agrochemicals strongly help increasing agricultural production and productivity; on the other hand, the loss of chemical fertilizers and the spread of pesticides due to surface runoff or leaching, for example, is an imminent watercourse-contamination source (Carpenter et al., 1998; Hansen et al., 2000).

Another issue negatively affecting different ecosystems lies on the dumping of untreated or ineffectively treated agro-industrial effluents in waterbodies (Ali et al., 2011). Tannery effluents (TE), which result from bovine skin processing (for leather production) conducted in tannery industries mainly located in South American and Asian countries (Sabumon, 2016), stand out among these effluents. The aforementioned industries have great economic importance in these countries, since the leather they produce is used as raw material by different sectors such as automobile, clothing, footwear, furniture, among others (China and Ndaro, 2015; Sabumon, 2016). However, this activity has great pollutant potential, since the effluents produced at different bovine skin processing stages contain several compounds, which are harmful to the health of distinct species (Estrela et al., 2017; Mendes et al., 2017; Souza et al., 2017a; Montalvão et al., 2017; Rocha and de-Oliveira, 2017; Montalvão et al., 2018).

The inappropriate disposal of domestic sewage in the environment has also caused severe environmental issues in different countries (Noorhosseini et al., 2017). The sewage discharge into rivers, streams and/or lakes leads to the dispersion of several aquatic pollutants such as surfactants, synthetic hormones, organic material, medicinal product residues, among others (Deblonde et al., 2011). Studies have shown that medicinal products have been mainly inserted into the environment through domestic sewage (Kanda et al., 2003; Östman et al., 2017), either through its excretion, personal hygiene or direct disposal into sewage systems (Daughton and Ruhoy, 2009).

Aiming at investigating the impacts from different contaminants found in surface waters on the biota, several studies have shown the negative effects from xenobiotics on different experimental models and helped better understanding how these pollutants affect species' survival and reproduction. Among them, it is worth highlighting the studies by Novelli et al. (2012), Bridi et al. (2017) and de Moura et al. (2017) - comprising agrochemicals; by Mennigen et al. (2017), Cardoso-Vera et al. (2017) and Zhou et al. (2017) - about residues of pharmaceutical origin; by Huang et al. (2003) - involving petroleum-derived pollutants; by Hecnar (1995), Yousef et al. (2017) and Abdelfattah et al. (2017) - comprising fertilizers; and by Adeel et al. (2017) and

Balmuri et al. (2017), which investigated synthetic hormones and surfactants, respectively.

Although the aforementioned studies play a key role in the identification and characterization of harmful effects from pollutants on different organisms, it is undeniable that they may not represent, in a more realistic way, what happens in the environment. Many of these investigations have assessed the effect from specific contaminants by adopting concentrations or doses much higher than those found in the environment. Moreover, many studies define the contaminant concentrations/doses to be assessed, based on acute toxicity tests (e.g., median lethal concentrations (LC₅₀) or median lethal doses (LD₅₀)), which are recommended for very specific cases, only. Thus, the prioritization of studies that do not represent real situations (i.e.: poorly applied), and/or that investigate the effects from a single pollutant on the biota, leads to the neglect of the fact that a great diversity of pollutants derived from different pollution sources is found in the environment. In addition, it is worth taking into consideration that certain pollutant combinations may interact and produce different toxic effects from those attributed to a specific contaminant type.

Therefore, the aim of the present study was to assess the impact from the chronic intake of water containing a mix of pollutants on the behavior of male C57Bl/6J mice exposed to potential predators; it was done in order to improve the knowledge about the effects from complex contaminant combinations on the biota. We herein assume that the intake of water containing several contaminants (at environmentally relevant concentrations) may lead these animals to develop defensive behavior disorders, and it allows better understanding the magnitude of the impacts these pollutants have on natural populations.

2. Materials and methods

2.1. Animals and experimental design

Male C57Bl/6J mice (nulliparous), belonging to the age group 21–32 days, were used in the present study; they were kept in the Animal House of the Biological Research Laboratory of Goiano Federal Institute – Urutaí Campus (GO, Brazil), according to conventional animal housing sanitation standards, at 22–24 °C, under 12 h light cycle, and 58% ± 3% controlled humidity. The animals were placed in polypropylene boxes for mice (41 cm long × 34 cm wide × 16 cm tall) covered with galvanized grille treated with antioxidant. Water (with or without treatment) and standard rodent food *ad libitum* were supplied to the animals.

Initially, 44 mice were counter-balanced according to co-variables “age” and “biomass”, so that their ages and body masses were statistically equal at the beginning of the experiment. Subsequently, the animals were distributed in the following experimental groups:

- 1) Control ($n = 11$) - consisted of animals that received pollutant-free drinking water;
- 2) Mix 1× ($n = 11$) - composed of animals that received water containing a mix of pollutants at concentrations previously found in surface waters (i.e., environmentally relevant concentrations);
- 3) Mix 10× ($n = 11$) - comprised animals that received water containing the mix of pollutants mentioned above, but at concentrations 10 times higher than the environmentally relevant ones;
- 4) Mix 25× ($n = 11$) - composed of animals that received water containing the aforementioned mix at concentrations 25 times higher than those set in the Mix 1× group.

The animals were exposed to the treatments by means of drinking fountains, for 105 days. Food and water (with or without pollutants) intakes were measured throughout this period by daily subtracting the leftover from the total amount offered in the previous day.

2.2. Mix of pollutants

The mix of pollutants adopted in the current study comprised 15 compounds, which had been already identified in surface waters in previous studies. It was done in order to simulate the intake of water deriving from watercourses fed by different pollution sources. The mix-constituent concentrations were set based on previous studies, which are specified in Table 1.

The medicinal products composing the group of pharmaceutical-origin residues were selected due to their high worldwide consumption and because they had already been identified in surface waters in previous studies (see references in Table 1). Glyphosate and abamectin were selected as pesticide representatives because they are widely used in the conventional agriculture adopted in different countries (Bai and Ogbourne, 2016; Tarazona et al., 2017).

Benzene was selected as representative of petroleum-derived residues, since it is one of the aromatic hydrocarbons widely used as raw material for several products, including gasoline (Barata-Silva et al., 2004). Nitrogen and household detergent were selected as representatives of fertilizers and surfactants, respectively, because they are the most used ones in conventional agriculture (Lu and Tian, 2017) and in general household cleaning (Scheibel, 2004), respectively. Estradiol, in its turn, was selected as representative of synthetic hormones, since previous studies have shown its increasing use by human populations, in association with other steroid hormones in oral contraceptives and contraceptive patches (Holtorf, 2009). The tannery effluent was selected as representative of agro-industrial wastes, since it is often directly discarded in waterbodies located close to bovine skin processing industries (Sabumon, 2016).

It is worth emphasizing that, similar to the study by Abreu et al. (2016), all the herein adopted mix components (medicinal products, estradiol, glyphosate, nitrogen, benzene, abamectin and detergent) were purchased in commercial establishments specialized, or not, in the

sale of chemical reagents (see brands in Table 1). It is also worth highlighting that abamectin was applied to the water supplied to the animals through the Kraft® 36EC commercial formulation, which is classified as acaricide, insecticide and nematicide (Montalvão and Malafai, 2017). Urea was the nitrogen source adopted in the current study, whereas the tanning effluent was collected in a tannery industry located in Inhumas County (Goiás State, Brazil); it was the same effluent used by Souza et al. (2017).

2.3. Chemical characterization of the pollutant mix

The physicochemical and chemical characterizations of the water supplied to the animals were performed according to the American Public Health Association (APHA) (Table 2) (APHA, 1997). The analysis applied to the organic compounds was carried out through mass spectrometry with electrospray ionization, according to the methodology described by Guimarães et al. (2016). Spectra containing the highest-intensity ions are shown in Fig. 1 (in "Supplementary material" online). Fig. 2 (in "Supplementary material" online) shows the nomenclature and the structural formula of the organic compounds. Table 3 (in "Supplementary material" online) shows the list of all ions detected through the herein adopted technique; the aforementioned ions presented the lowest intensities in the mass spectra shown in Fig. 1 (in "Supplementary material" online).

2.4. Behavioral assessments

We herein assume the hypothesis that the chronic intake of water containing a diversity of pollutants could cause changes in neurocerebral regions responsible for animals' defense responses; thus, we subjected the mice to different behavioral tests after this day. Before conducting the test to measure the animals' response to potential predators, we assessed whether the treatments caused changes in their locomotor, visual, olfactory and auditory abilities, which are essential to rodent defense responses. All the animals were subjected to experimental paradigms pointing towards deficit in the aforementioned abilities. Thus, mice were subsequently subjected, at different days, to the open field test, to the locomotion test induced through luminous source

Table 1
General information about the components of the mix offered to male C57Bl/6J mice for 105 days.

| Group | Class of constituents | Active ingredient | Brands | Mix 1× (ERC) | References (ERC) | Mix 10× | Mix 25× |
|-----------------------|-----------------------|-----------------------------|--|--|-----------------------------------|---------------------------------------|--|
| Pharmaceutical | Antibiotic | Amoxicillin | Prati, Donaduzzi & Cia Ltda, Toledo, PR, Brazil | 0.0045 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ | Sodré et al. (2010) | 0.045 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ | 0.1125 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ |
| | Anti-inflammatory | Acetylsalicylic acid | Bayer Pharma AG, Leverkusen, Germany | 0.34 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ | Ternes (1998) | 3.4 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ | 8.5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ |
| | | Sodium diclofenac | Vittamed, Caxias do Sul, RS, Brazil | 1.8 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ | Hoeger et al. (2005) | 18 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ | 45 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ |
| | Antidepressant | Ibuprofen | TEUTO, Anápolis, GO, Brazil | 2.7 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ | Flippin et al. (2007) | 27 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ | 67.5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ |
| | | Fluoxetine | Zydus Nikkho, Rio de Janeiro, RJ, Brazil | 0.030 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ | Perreault et al. (2003) | 0.30 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ | 0.75 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ |
| | Anxiolytic | Clonazepam | Legrand Pharma, Hortolândia, São Paulo, SP, Brazil | 0.053 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ | Ternes et al. (2001) | 0.53 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ | 1.325 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ |
| | Analgesic | Dipyron monohydrate | CIMED, Porto Alegre, RS, Brazil | 5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ | Pamplona et al. (2011) | 50 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ | 125 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ |
| Antacid | Ranitidine | TEUTO, Anápolis, GO, Brazil | 10 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ | Boxall (2004) | 100 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ | 250 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ | |
| Hydrocarbon | Benzene | Benzene | Proquímios, Rio de Janeiro, RJ, Brazil | 0.005 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ | Brasil (2004) | 0.05 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ | 0.125 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ |
| Agro-industrial waste | Tannery effluent | – | – | 1% | Rabelo et al. (2016) | 10% | 25% |
| Synthetic hormone | Estradiol | Estradiol cypionate | ZOETIS PFIZER, Itapevi, SP, Brazil. | 2.6 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ | Jardim et al. (2012) | 26 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ | 65 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ |
| Fertilizer | Nitrogen | Nitrogen | USI FERTIL®, Maruim, SE, Brazil | 2.4 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ | Xu et al. (2014) | 24 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ | 60 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ |
| Pesticide | Glyphosate | Glyphosate | UPL, Ituverava, SP, Brazil | 0.70 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ | Peruzzo et al. (2008) | 7 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ | 17.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ |
| | Kraft® 36EC | Abamectin | Bayer CropScience Ltda., Belford Roxo, RJ, Brazil. | 0.004 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ | Vasconcelos et al. (2016) | 0.04 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ | 0.1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ |
| Surfactant | Detergent | – | Start, São Paulo, SP, Brazil | 740 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ | Mortatti et al. (2012) | 7.400 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ | 18.500 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ |

Caption: ERC: Environmentally relevant concentrations (Mix 1×).

(visual test), as well as to olfactory and auditory tests; next, they were subjected to response-to-predator tests (cats and snakes).

All tests were conducted in the test room under 12 h light cycles. The room had acoustic isolation, artificial light with control system, controlled temperature (23 °C to 25 °C) and three infrared video cameras coupled to a computer outside the room. All the tests were video recorded for further analysis. Next, we present all the procedures adopted for each test.

2.4.1. Open field test

The open field test – which is a widely adopted experimental paradigm to assess rodent locomotor activity (Carola et al., 2002; Prut and Belzung, 2003) – was performed at the 93th experimental day. Accordingly, we used a round arena (28 cm diameter) surrounded by a rounded wall (45 cm tall); the bottom of the arena was divided in 12 quadrants. The test session started when the animal was individually placed in the center of the arena and allowed to freely explore the open field for 5 min. The apparatus was sanitized with 10% alcohol between sessions. The locomotor activity of each mice was measured based on the total crossing frequency between quadrants (central and peripheral) throughout the total recording time by using the OpenFLD software. Moreover, we calculated the animal locomotion in the central quadrants/total animal locomotion ratio in order to assess the possible anxiogenic or anxiolytic effect from the treatments on the animals before they were subjected to the anti-predatory response test. According to Prut and Belzung (2003), the lower locomotion rate in the central quadrants and, consequently, the high locomotion rate in the lateral quadrants can be used as anxiety index.

2.4.2. Assessing the animals' locomotor performance through the Basso Mouse Scale

In order to complete the locomotor activity assessment (with special attention given to biomechanical parameters) during the open field test, the animals were assessed according to scores set by the Basso Mouse Scale (BMS) (Basso et al., 2006) (9-point scale), which is a widely-used, validated, semi-quantitative rating scale for locomotor assessment. Such scale has been considered a useful tool to assess the motor performance of rodents exposed to complex-constitution pollutants (Mendes et al., 2017).

2.4.3. Locomotion test induced by luminous source (visual test)

The visual test was performed at the 56th experimental day, it was used to assess whether the treatments influenced the animals' visual perception. We applied the locomotion test induced by luminous source based on previous studies by Johnson et al. (2010), Polosukhina et al. (2012) and Macé et al. (2015). The apparatus used in this test consisted of a transparent polyethylene cylinder (3.8 cm diameter, 28.8 cm length) containing a luminous LED light source (*Light Emitting Diode*) (100 W, bright blue – 470 nm) located 4.5 cm away from one of its tips. The apparatus was divided in three different zones (zone 1: the closest to the luminous source, zone 2: neutral zone, and zone 3: the farthest from the luminous source).

Lights in the test room were kept off, each animal was placed inside the apparatus with the nose turned towards the luminous source (off) for 2 min to acclimate. After this period, while the animal still had its nose turned towards the luminous source (specifically in zone 1), the LED lamp was turned on, and left this way, for 2 min. The animal was recorded by an infrared camera located above the apparatus during the acclimation (without LED lamp) and test (with LED lamp) periods. The apparatus was sanitized with 10% alcohol between sessions and the LED lamp position at the tip of the apparatus was changed to exclude potential influences from the preference for certain spatial locations of the luminous source.

After the recording sessions, we assessed the latency time spent by the animal to make a complete turn around its body after the LED lamp was turned on, according to the method suggested by Johnson

et al. (2010). Moreover, we assessed the locomotor activity of the animal in the apparatus, which was measured through the total number of crossings in zones 1, 2 and 3 with the aid of the OpenFLD software.

2.4.4. Olfactory test

The olfactory test was performed at the 95th experimental day, according to Kobayakawa et al. (2007), with adaptations. This test was conducted in a standard polypropylene box for mice, which had transparent glass cover. Before running the test, each animal was placed in the center of the box and left in the test room for 15 min, for acclimation.

A piece of filter paper (2 cm²) containing 20 µL of distilled odorless water was placed inside the box from the 15th to the 19th experimental minute; and removed from the box after 1 min. A clean filter paper was used for each animal and the distilled water was placed in the box right before the test in order to prevent it from evaporating. The filter paper positions were changed every minute in order to exclude potential influences from the preference for a certain spatial location.

A filter paper (2 cm²) containing 20 µL of citronella oil was placed in the box of the animal at the 20th minute. A clean filter paper was used for each “test” mouse and the citronella oil was also placed in the box right before the test session in order to prevent the oil odor from volatilizing. It is worth highlighting that the citronella oil was chosen because a previous study had already evidenced that rodents have high sensitivity to its smell (Singla and Kaur, 2014), thus characterizing a good olfactory-accuracy indicator in animals.

The apparatus was sanitized with 10% alcohol between sessions. Besides, it is important emphasizing that all the procedures were conducted by researchers who used gloves, mask and caps; they did not wear perfume, moisturizer or any other cosmetic product in order to minimize the outspread of odors that could negatively influence the test. The sessions containing odorless papers, or papers with repulsive odor (citronella oil – at 10%), were recorded and, subsequently, the time the mice spent exploring the filter paper with, or without, olfactory stimulus was recorded.

2.4.5. Auditory test

The auditory test, adapted from Frings et al. (1951), was conducted at the 96th experimental day in an apparatus that comprised four standard polypropylene boxes for mice containing a transparent glass covering the entire box. The animals remained in the test room for 5 min (acclimation period) after they were placed in the boxes. Next, an unbearable sound was reproduced by a speaker located inside the test room, and it was kept on for more than 5 min (at 90 dB). The apparatus was sanitized with 10% alcohol between sessions.

The following parameters were assessed after the recording procedure, either in the acclimation period or during the test session: locomotor activity of the animals, time and frequency of freezing and self-grooming behaviors. It is worth emphasizing that the locomotor activity of mice in the apparatus was assessed through the number of crossings over three virtual lines dividing each box in six sectors, which were displayed on the computer screen during the analysis applied to the recording.

2.4.6. Response-to-predator tests

After the tests set to assess possible changes in the locomotor, visual, olfactory and auditory abilities were conducted, mice were subjected to two specific tests. These tests allowed analyzing the hypothesis that treatments could affect the central nervous system of the animals, thus harming their responses to predators. Accordingly, the animals were exposed to a cat and a snake as predatory stimuli, since they are mice's natural predators, according to Frings et al. (1951). The apparatus avoided the physical contact between predators and mice, but it enabled visual, olfactory and auditory stimuli to the animals. Next, we present the details of procedures adopted in the respective tests.

2.4.6.1. Response-to-feline predator (cat) test. The animals were subjected to the response-to-predator (a cat) test, adapted from Mendes et al. (2017), at the 100th experimental day. An apparatus consisting of an aquarium (35 cm long × 25 cm wide × 20 cm tall) coupled to a cage (with the same dimensions as the aquarium) on its upper side was used in the test. The side-walls of the aquarium were made of white opaque glass and the front wall was made of transparent glass. There was a lair (35 cm long × 25 cm wide × 20 tall) inside the aquarium, and it was supposed to simulate a shelter/refuge to the mice.

Two male domestic cats (*Felis catus*) presenting similar fur pattern and same age were used as predators; they fasted for 8 h before the test session in order to stimulate their predatory instincts. It is necessary pinpointing that each cat was used to test a single mouse, since the mice recordings were done in pairs in the same test room; therefore, it was necessary having two predators available.

The aforementioned test was running in two sessions; in the first session, each mouse was placed inside the aquarium and the cage coupled to its upper surface did not host a predator. Animals were allowed to explore the apparatus for 5 min (adaptation/acclimation session). Next, the mouse was taken out of the apparatus and put back in its residence box in the animal house. The aquarium was sanitized with 10% alcohol between sessions. The second session would start after all the animals were subjected to the first one. Right after the animal was placed inside the aquarium in the second session, a cage (hosting a cat) presenting the same dimensions of that used in the first session (adaptation/acclimation) was coupled to the aquarium. A cat roaring sound (65 db) was also reproduced every 30 s to make sure that the mouse would hear it after the test had started. It was done to make sure that the mouse would be teased by the predator sound stimulus throughout the test session. The reproduced sound was previously recorded in the test room itself, three months before the behavioral test, using the same cats used in the tests. The volume of the reproduced sound was set by previously measuring the vocalization of the animals.

After the cage hosting the cat was coupled to the aquarium, the mouse was recorded for additional 5 min. Again, the apparatus was sanitized with 10% alcohol between sessions. The following parameters were analyzed after the recordings: time spent by the mouse in the lair, time showing self-grooming behavior and freezing frequency. All these parameters (in the absence, or presence, of a cat) were quantified in the PlusMZ software.

2.4.6.2. Response-to-a-snake test. The response-to-predator using a snake (two *Corn Snake - Pantherophis guttatus*) was performed at the 105th experimental day; the snakes were fed mice. They were adult snakes presenting the same color patterns (*Okeete* – normal or common), as well as the same sex (male) and age (4 years old). The snakes fasted for 40 days before the test.

The snakes belonged to Goiânia Zoo (GO, Brazil) and were provided just for the conduction of the test and taken back to the zoo afterwards. It is worth highlighting that similar to the recordings with the cats, each snake was used to perform the test with a single mouse at the time. The mice recordings were carried out in pairs in the same test room; therefore, it was necessary having two snakes as predators for the tests.

The adopted procedures and the apparatus used in the response-to-predator (snake) test were identical to those used in the response-to-predator (cat) test. Mice explored the apparatus without the snake for 5 min in the first session; the predatory stimulus was introduced in the second session. Simultaneously, the sound produced by the snake's rattle (65 db) was also reproduced for 30 s, every 30 s, in order to assure the sound stimulus from the snake predator to the 'test' mouse, just as it was done with the feline predator. The animals were recorded for additional 5 min and, next, the following parameters were analyzed (in the absence and presence of a snake): time spent in the lair, time showing self-grooming behavior and freezing frequency. We also used the PlusMZ software in this test.

2.5. Body biomass and relative mass of organs

The body biomass of the animals was measured at the beginning and at the end of the experimental period. In addition, the animals were euthanized the day after the last behavioral test was concluded; their brain, liver, spleen and kidneys were removed and weighed. The relative mass of these organs was calculated to allow assessing possible systemic toxicity. In order to do so, the mass of each organ (g) was divided by the body biomass of the animal (g), which was measured on the day it was euthanized.

2.6. Bioconcentration

The Cr and Mg levels in the animals' blood were measured at the end of the experiment, because these metals were found at high concentrations in the water containing the pollutant mix. Their concentrations were measured in order to investigate a possible link between the pollutant mix absorption and the defensive responses of animals. It is worth emphasizing that the option made for measuring these elements in the blood is justified by the fact that it is the main nutrient or toxic agent distribution fluid able to reach other systems (Perez-Gonzalez et al., 2017).

Both elements were quantified through inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) (Element, Finnigan MAT, Germany), according to Souza et al. (2017b), with modifications. Briefly, brain and blood were macerated and digested in an Erlenmeyer flask screw-cap containing 2 mL of wet digestion solution (75% nitric acid (HNO₃): 70% perchloric acid (HClO₄) = 1:1 v/v). Next, the samples were placed on a hot plate at 100 °C, for 6 h. After the samples were digested, the cap (clock glass) was removed and the heating process was kept at 80 °C until achieving complete drying. Subsequently, 5% HNO₃ was added in order to dissolve the sample residue and complete the final volume at 5 mL. Then, the resulting solution was diluted in 5% HNO₃ and the total dilution corresponded to 5000 times the original sample weight. The solution was analyzed through ICP-MS. The calibration standards 0.1, 1.0 and 10 mg·kg⁻¹ Cr and Mg were used to validate the method.

2.7. Statistical analyses

All data were initially subjected to normality Shapiro-Wilk test, which was followed by the Levene homogeneity variance test. Data from the open field and locomotion (induced by luminous source – visual test) tests were subjected to simple analysis of variance (*one-way ANOVA*), followed by Tukey test at 5% probability, in case of significant F. Data presenting abnormal distribution were subjected to the non-parametric Kruskal-Wallis test at 5% probability.

Data about the body biomass, olfactory and auditory tests, as well as about the response-to-predator (cats and snakes) test were subjected to analysis of variance (*two-way ANOVA*), according to the factorial design 2 × 4. We adopted factors "treatment" (at three levels: control, EC1x and EC 1000x) and "time" (at two levels: beginning and end of the experiment – in the case of body biomass), as well as factor "stimulus 1" (at two levels: with and without olfactory stimulus – citronella oil in the olfactory test), "stimulus 2" (at two levels: with and without the auditory stimulus – 90 db sound in the auditory test) or "stimulus 3" (at two levels: with and without the feline predator stimulus – cat in the response-to-predator test) or, yet, "stimulus 4" (at two levels: with and without the snake in the response-to-predator test). Multiple comparisons were conducted through the Tukey post-hoc test at 5% probability, in case of significant F. It is important emphasizing that the non-parametric data were turned into log(x) and then subjected to two-way ANOVA. Correlation analysis was performed using Spearman's method. All the analyses were conducted in the GraphPad Prism software (version 6.0). Moreover, all graphs were generated in the same software.

3. Results and discussion

Our analyses showed increased body mass in all the animals at the end of the experiment in comparison to that measured at the beginning of it (Fig. 3A - in 'Supplementary Material' online). However, there was no significant difference in body mass gain between groups (Fig. 3B - in 'Supplementary Material' online). On the other hand, the animals subjected to the highest pollutant concentrations (Mix 10× and 25×) presented daily food (Fig. 3C - in 'Supplementary Material' online) and water (Fig. 3D - in 'Supplementary Material' online) intake lower than that of the control group. A dose-dependent effect was observed in the water intake parameter.

According to Malafaia et al. (2015), body biomass and eating behavior are good animal intoxication indicators, mainly when it comes to intoxications caused by systemic-effect xenobiotics. However, although the animals belonging to groups Mix 10× and Mix 25× presented lower water and food intake, they did not show body mass difference during the experiment (Fig. 4A - in 'Supplementary Material' online) or at the end of the experimental period (Fig. 3A - in 'Supplementary Material' online). Thus, it is tempting speculating that there have been physiological adaptations able to help maintaining the physical integrity of the herein assessed animals. These changes may be related to the production of hormones, which play prominent roles in the regulation of body composition, energy intake and expenditure, as well as to adaptations in the mitochondrial efficiency and adaptive thermogenesis (Trexler et al., 2014). This hypothesis is reinforced by the lack of differences in the relative mass of metabolically active organs such as liver, brain, kidneys and spleen (Fig. 4B - in 'Supplementary Material' online).

With respect to the behavioral performance of the animals, the parameter “total number of crossings” did not show significant differences between groups in the open field test (Fig. 5B); similar result was

recorded in the BMS scores between groups (Fig. 5C). These data suggest that the treatments did not cause locomotor hyper or hypoactivity, or even biomechanical changes able to negatively affect the animals' responses in the subsequent tests. In addition, we did not observe anxiolytic or anxiogenic effects resulting from the treatments in the analysis applied to the animal locomotion in the central quadrants/total animal locomotion ratio, which was calculated for each group in the open field test (Fig. 5D). This result also suggests that the chronic exposure to the pollutant mix - even at concentrations 10 and 25 times higher than the environmentally relevant ones - did not lead to changes in the neural pathways or mechanisms that often lead to anxiety. According to Berton et al. (1998), changes in the emotional state of rodents, before the animals get exposed to predatory clues, may negatively affect their anti-predatory response.

Moreover, the animals did not show differences in the “average latencies (s) to first complete turn after light onset” during the visual test (Fig. 6B), and it allowed us inferring that the treatments did not cause visual deficit when the mice were stimulated by an aversive light source. On the other hand, it was possible observing the effect from factor “stimulus” on the time the animals spent exploring olfactory clues in different sessions of the olfactory test (Fig. 6D). The time mice from all groups spent exploring the olfactory clue with aversive smell was shorter than that spent exploring the odorless filter paper, thus showing that the animals' ability to recognize odor stimuli was intact.

The current data also suggest that the chronic intake of water containing different pollutants (at different concentrations) did not cause changes in the hearing abilities of the animals. The locomotor activity (Fig. 7B) and the freezing behavior frequency (Fig. 7C) increased after the aversive sound was reproduced in the test room. In addition, animals belonging to all groups spent less time on self-grooming when they were exposed to sound stimulus (Fig. 7D). Therefore, these results

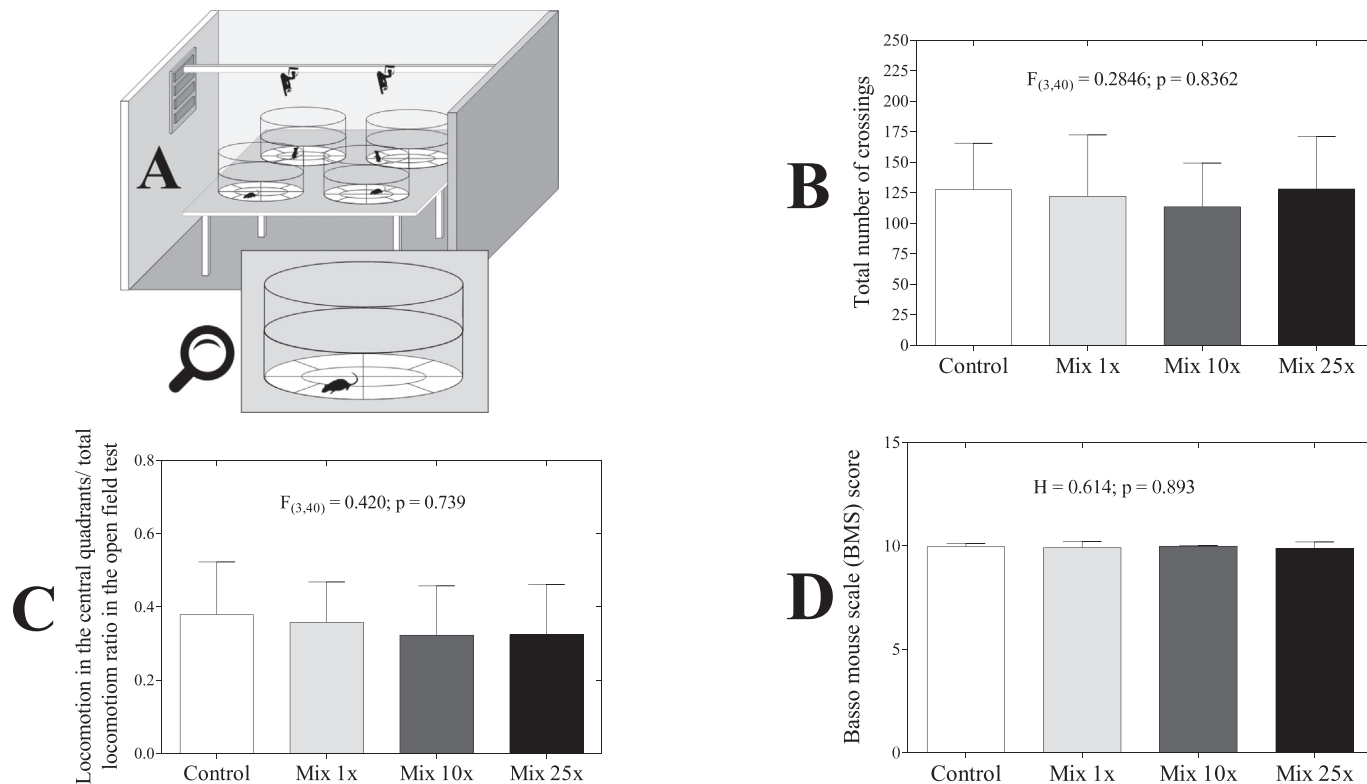


Fig. 5. (A) Two-dimensional image showing the test room and the apparatus used in the open field test and (B) total number of crossings in the open field quadrants. (C) Mean scores recorded in the Basso Mouse Scale for locomotion and (D) locomotion in the central quadrants/total locomotion ratio in the open field test applied to male C57Bl/6J mice exposed or not to the chronic intake of water containing a mix of pollutants at different concentrations. In “B and C”, data were subjected to one-way ANOVA, whereas in “D”, data were subjected to the Kruskal-Wallis test, both at 5% probability. Mix: mix of pollutants at environmental relevant concentration (1×), 10 times higher (10×) and 25 times higher (25×). $n = 11$ animals/group.

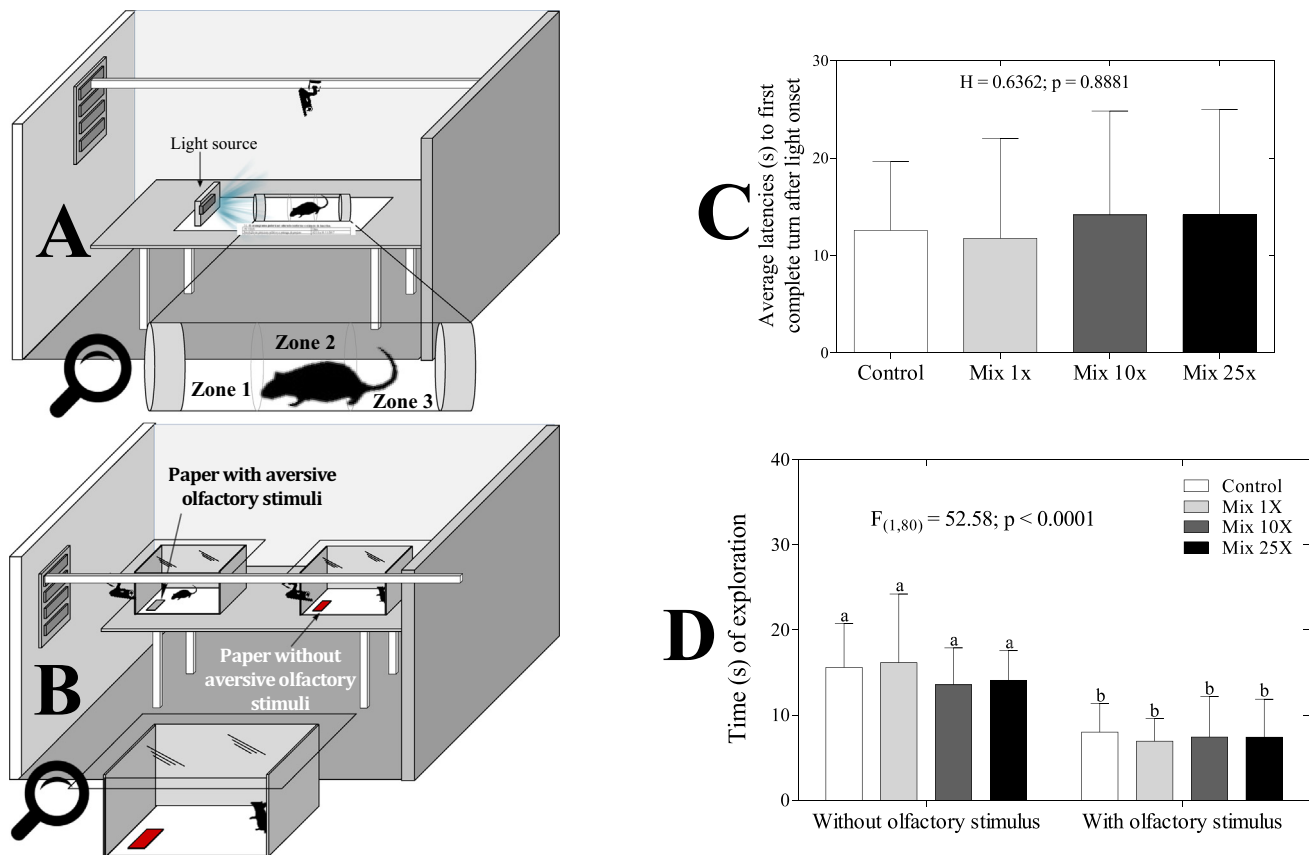


Fig. 6. Two-dimensional image showing the test room and the apparatus used in the visual and (A) olfactory (B) tests. (C) Latencies to first complete turn after light onset and (D) olfactory stimulus exploration time spent by male C57Bl/6J mice exposed or not to the chronic intake of water containing a mix of pollutants at different concentrations. In “C”, data were subjected to the Kruskal-Wallis test, at 5% probability. In “D”, data were subjected to two-way ANOVA; results were subjected to multiple comparisons to those recorded in the Tukey’s post-hoc test, at 5% probability. Different lowercase letters indicate significant differences. Mix: mix of pollutants at environmental relevant concentration (1×), 10 times higher (10×) and 25 times higher (25×). $n = 11$ animals/group.

suggest that the animals reacted to the aversive sound; this reaction directly depends on their ability to listen to the auditory stimulus and to process information at neurological level.

Thus, it is possible stating that the results presented so far suggest that the animals’ locomotor (Fig. 5), visual, olfactory (Fig. 6) and auditory abilities (Fig. 7), which are essential to trigger defensive responses in rodents (Apfelbach et al., 2005; Hacquemand et al., 2010; Greene et al., 2014), were not affected by the intake of water containing mix of pollutants at different concentrations.

Animals were subjected to the feline predator response test, after the lack of changes in their sensitive abilities was confirmed. It was possible seeing that mice belonging to all groups, except for the Mix 25× group, remained longer in the lair when the cat was introduced in the apparatus in comparison to the permanence time recorded in the session performed without the predator (Fig. 8B). Thus, we can infer that the animals in the control, Mix 1× and Mix 10× groups recognized the lair as a safe place, as a place to take refuge and hide. On the other hand, only the animals in the control group showed longer freezing (Fig. 8C) and self-grooming behaviors (Fig. 8D) when they were subjected to predatory stimuli.

If we take increased freezing and decreased self-grooming as sensitive stress and fear-related behavioral markers (Blanchard and Blanchard, 1988; Graeff, 1994; Kalueff and Tuohimaa, 2005), the current data suggest that the mice’s capacity to recognize the cat as potential predator was influenced by the intake of water containing several pollutants. The Cr and Mg found in the blood of the animals exposed to the pollutants (Fig. 9A–B), besides indicating that the ingested contaminants were absorbed, reinforces the hypothesis that the mix affected the defensive response of the animals. The analyses performed in the

current study showed significant correlation between variables such as “time spent showing freezing behavior vs. Cr ($r = -0.5018$; $p = 0.0034$) and Mg concentration in the blood ($r = -0.362$; $p = 0.041$)”; as well as between “time spent showing self-grooming behavior vs. Cr ($r = -0.424$; $p = 0.015$) and Mg concentration in the blood ($r = -0.568$; $p = 0.0007$)”, fact that also reinforces our hypothesis. On the other hand, animals subjected to the ophidian predator response test did not show differences in the amount of time they showed behaviors such as permanence in the lair (Fig. 9B), freezing (Fig. 10C) and self-grooming (Fig. 10D), which was recorded in different sessions of the test.

The current study is pioneer in showing that the chronic intake of water containing a mix of pollutants may adversely affect the ability of mice to recognize a potential feline predator. Thus, although the biological mechanisms leading animals to show behavioral response deficit were not the focus in the current study, these mechanisms may be complex and comprehensive due to the chemical diversity of the herein used pollutant mix. Table 1 confirms the presence of highly toxic chemical elements (e.g., chromium), whereas Table 2 (in ‘Supplementary Material’ online) and Fig. 2 (in ‘Supplementary Material’ online) show the variety of potentially toxic organic compounds found in the water supplied to the animals. Therefore, it is tempting speculating that the chemical constituents of the pollutant mix may have individually, synergistically and/or collectively affected, in a negative way, the hypothalamic circuitry involved in the integration of rodents’ defensive responses to potential predators. Studies conducted by Martinez et al. (2008), Wang et al. (2015) and Kunwar et al. (2015) confirmed the critical role played by limbic hypothalamus regions in the performance of anti-predatory responses.

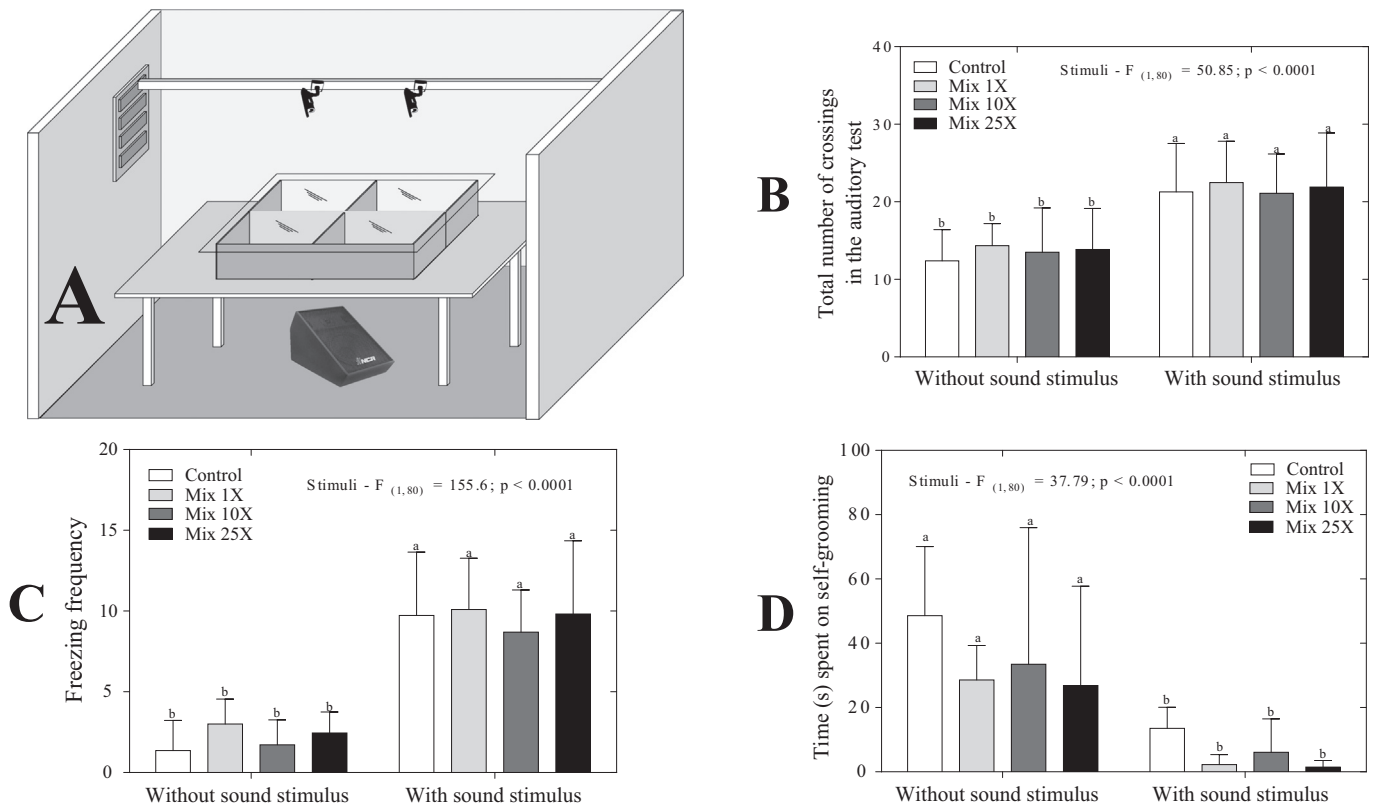


Fig. 7. (A) Two-dimensional image showing the test room and the apparatus used in the auditory test, (B) total number of crossings, (C) freezing frequency and (D) time spent on self-grooming (when the unfamiliar and aversive sound was reproduced) by male C57B1/6J mice exposed or not to the chronic intake of water containing a mix of pollutants at different concentrations. The bars represent the mean + standard deviation from the original data, which were transformed into log (x) in order to be subjected (a posteriori) to two-way ANOVA. Multiple comparisons to the Tukey post-hoc test were performed at 5% probability. Different lowercase letters indicate significant differences. Mix: mix of pollutants at environmental relevant concentration (1×), 10 times higher (10×) and 25 times higher (25×). n = 11 animals/group.

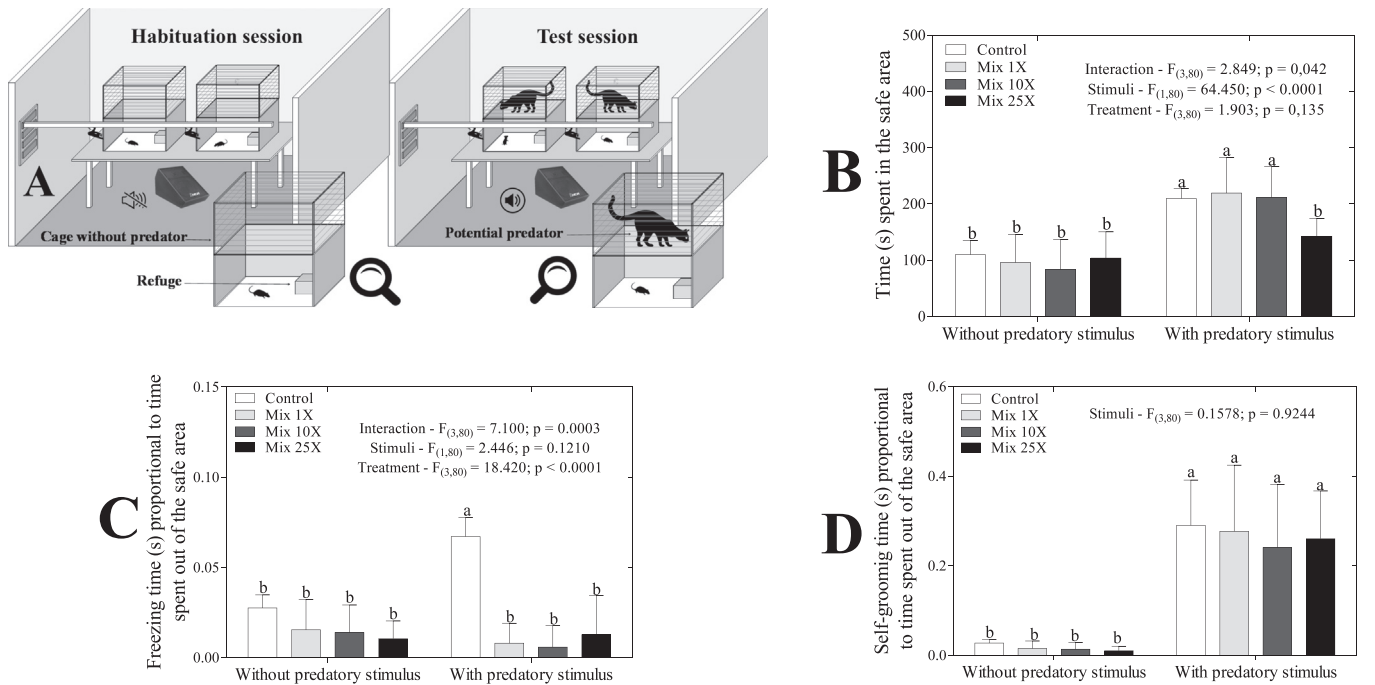


Fig. 8. (A) Two-dimensional image showing the test room and the apparatus used in the feline predator response test (acclimation and test sessions). (B) Time spent in the “lair” (safe area), (C) showing freezing and (D) self-grooming behaviors of male C57B1/6J mice exposed or not to the chronic intake of water containing a mix of pollutants at different concentrations. The bars represent the mean + standard deviation from the original data, which were transformed into log (x) in order to be subjected (a posteriori) to two-way ANOVA. Multiple comparisons to the Tukey post-hoc test were performed at 5% probability. Different lowercase letters indicate significant differences. Mix: mix of pollutants at environmental relevant concentration (1×), 10 times higher (10×) and 25 times higher (25×). n = 11 animals/group.

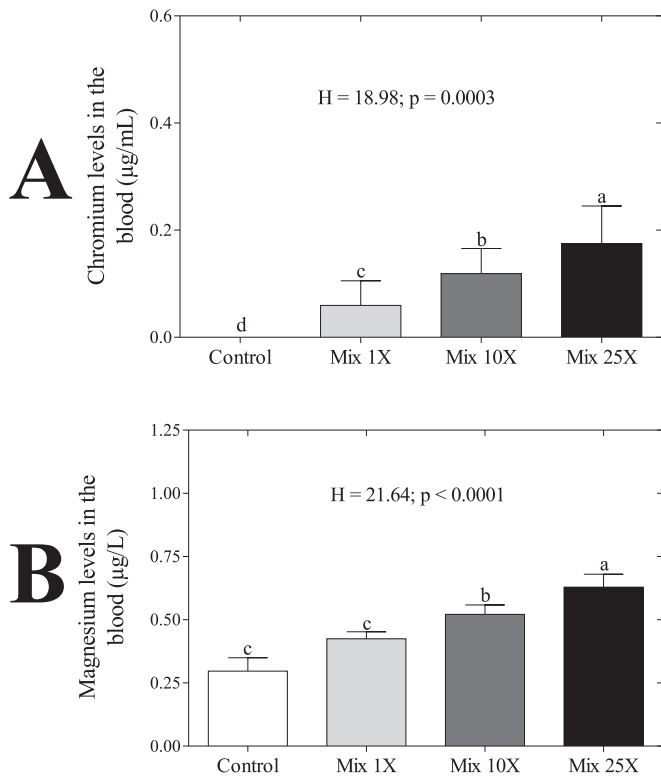


Fig. 9. Chromium (A) and magnesium (B) levels in the blood of male C57Bl/6j mice exposed or not to the chronic intake of water containing a mix of pollutants at different concentrations. The bars represent the mean + standard deviation from the original data, which were subjected to the Kruskal-Wallis test, with Dunn's post-hoc test, at 5% probability. Different lowercase letters indicate significant differences. Mix: mix of pollutants at environmental relevant concentration (1×), 10 times higher (10×) and 25 times higher (25×). $n = 11$ animals/group.

In addition, we cannot neglect the possibility that these constituents have worked at biochemical or molecular level in structures such as different sessions in the hypothalamic medial zone (Martinez et al., 2008), mainly in the dorsomedial part of the ventromedial nucleus (VMHdm), in the dorsal preammyllary nucleus (PMd) and in the anterior hypothalamic nucleus (AHN), which are highly interconnected, as well as classically involved in fear-related responses triggered in "threatening" situations (Canteras et al., 1997). Previous studies showing reduced defensive response in rodents with neuronal lesions in the VMHdm (Kunwar et al., 2015); in the PMd (Canteras et al., 1997; Blanchard et al., 2003; Markham et al., 2004; Cezario et al., 2008) and in the AHN (Schwerdtfeger and Menard, 2008) reinforce this hypothesis.

We also believe that there may have been changes in Fos protein expression (a product from the immediate-early *c-Fos* gene and considered a specific neuronal activity marker), mainly in hypothalamic regions linked to the defensive response in rodents. Such assumption finds support in different studies that have already reported increased Fos protein expression during rodent exposure to potential predators (Vianna et al., 2003; Canteras et al., 2008., de Oliveira-Crisanto et al., 2015), as well as in studies that evidenced changes in the aforementioned protein expression, both in rodents (Cheng et al., 2002) and in other experimental models exposed to pollutants (Topal et al., 2015).

In addition, it is possible stating that the xenobiotics found in the mix of pollutants supplied to the animals may have played a role in the functional dysregulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, thus directly affecting the production of hormones - such as corticosterone -, which are clearly increased in rodents exposed to potential predators (Anisman et al., 2001; Amaral et al., 2010). Although these hormones do not regulate animal behavior, they induce chemical changes in specific neuron clusters and lead to behavioral outcomes more likely to happen in certain environmental contexts, thus strengthening or weakening particularly important neural pathways (Korte, 2001). According to Korte (2001), corticosteroids are hormones that enable physiological adaptation in animals in order to help them processing information about potentially dangerous environments or situations. The different pollutants forming the mix adopted in the current study, although at

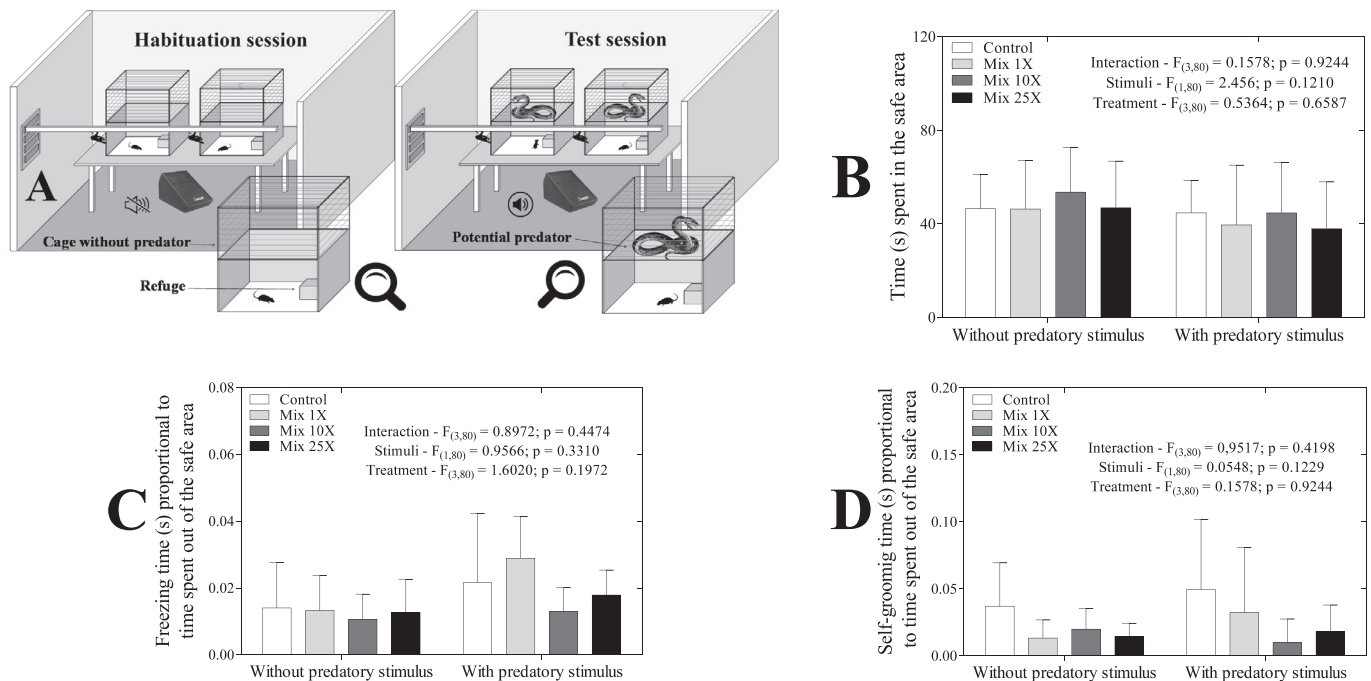


Fig. 10. (A) Two-dimensional image showing the test room and the apparatus used in the ophidian predator response test (acclimation and test sessions). (B) Time spent in the 'lair' (safety area), (C) showing freezing and (D) self-grooming behavior by male C57Bl/6j mice exposed or not to the chronic intake of water containing a mix of pollutants at different concentrations. The bars represent the mean + standard deviation from the original data, which were transformed into $\log(x)$ in order to be subjected (a posteriori) to two-way ANOVA at 5% probability. Mix: mix of pollutants at environmental relevant concentration (1×), 10 times higher (10×) and 25 times higher (25×). $n = 11$ animals/group.

low concentrations, may have worked as environmental endocrine disruptors (EEDs) and negatively affected mechanisms involving some corticosterone receptors, mainly the mineralocorticoid (MR) and glucocorticoid (GR) receptors, which potentiate or attenuate animals' defensive responses (Korte, 2001). Previous studies about the harmful effects from chemical products (individually used or used as complex contaminant mixes) on the function of these receptors reinforce this hypothesis (see Odermatt and Gummy, 2008). It is possible saying that studies reporting changes in anti-predatory responses presented by other animal models (e.g.: fish, amphibians, birds, insects and crustaceans) than rodents reinforce our argument (see Clotfelter et al., 2004).

Therefore, these speculations show how complex the effect from the intake of water containing a great diversity of chemical components (such as those herein supplied to mice) on the body can be. Thus, it is necessary conducting further studies to confirm our hypotheses, as well as to identify what (organic or inorganic) components of the chemical mixture are able to contribute to the emergence of the herein observed effects, in a more effective way.

It is worth highlighting that it is consensus that the defensive behavior of rats and mice depends on several factors able to modulate anti-predatory behavioral categories such as: characteristics of the environment and of the threat, which may vary from predator to predator; ii) distance between the prey and its potential predators; iii) types and intensity of predatory stimuli (visual, olfactory and/or auditory) presented to rodents; iv) animals' previous experience with the stimulus and with the environment; and (v) differences among sex, age and assessed rodent lines (Kavaliers and Choleris, 2001; Blanchard et al., 2003). Therefore, it is likely that the herein assessed animals (including those in the control group) did not identify the snake as predatory threat, since the stimuli (visual, olfactory and auditory) provided by this potential predator may not have been sufficient for the animals to perceive the risk and, consequently, to activate brain areas related to fear. This assumption is reinforced by de Oliveira-Crisanto et al. (2015), who did not find defensive response in male Swiss mice exposed to snake smell. At the time, the authors suggested that the olfactory clue of the snake may have been considered a new, but non-threatening, stimulus by the rodents. It is also possible that the herein used experimental model had gender-specific differences in the perception of ophidian predators; females may be more sensitive than males, as shown by Weldon et al. (1987). In addition, the influence from the species, size, color and nutritional status of snakes to be used in potential ophidian predator response tests cannot be neglected. These characteristics may be a decisive factor in the activation of neural mechanisms responsible for triggering anthropogenic responses.

Finally, it is worth taking into consideration that assessing animals in other contexts (environmental and predatory) may help improving the knowledge about the effects from pollutant mix intake on the behavioral biology of mammals. Future studies should focus on investigating the effects from the short-term intake of these pollutants (i) on the behavior of both males and females; ii) on the possible genetic influence of the animals, as well as iii) on neural/physiological mechanisms that may be essential for animals' susceptibility or resistance to negative effects from contaminants on their defensive responses.

4. Conclusions

Our data corroborate the hypothesis that the chronic intake of water containing a mix of pollutants (even at small concentrations considered environmentally relevant) may lead to changes in the defensive responses of C57Bl/6J mice. However, it appears that the effect from pollutants (in complex mixtures) on the neural circuits linked to defensive responses can be modulated through the animals' risk perception; the present study recorded responsive deficit when the feline predatory stimulus alone was presented to the animals. By considering that anti-predatory behavior disorders can affect prey fitness and population dynamics, we herein suggest that future studies should focus not

only on the biological mechanisms leading to the herein observed changes, but also on other possible impacts on the health of animals exposed to the intake of water containing complex pollutant mixes whose origin may be related to several and distinct pollution sources.

Acknowledgment

The authors are grateful to the Brazilian National Council for Research (CNPq) (Brazilian research agency) (Proc. No 467801/2014-2) and Instituto Federal Goiano for the financial support (Proc. No 23218.000286/2017-21). Moreover, the authors are grateful to the CNPq for supporting scholarship to the student who developed this study.

Funding

This study was funded by Brazilian National Council for Research (CNPq) (Brazilian research agency) (Proc. No 467801/2014-2) and Instituto Federal Goiano – Campus Urutaí (GO, Brazil) (Proc. No 23218.000286/2017-21).

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval

All the procedures were approved by The Ethics Committee on Animal Use of Goiano Federal Institute (*Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Federal Goiano*), GO, Brazil (protocol No. 6339041117). Meticulous efforts were made to assure that the animals suffered the least possible and to reduce external sources of stress, pain and discomfort. The current study did not exceed the number of animals necessary to produce trustworthy scientific data. This article does not contain any studies with human participants performed by any of the authors.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.02.040>.

References

- Abdelfattah, E.A., Augustyniak, M., Yousef, H.A., 2017 Sep. Biomonitoring of genotoxicity of industrial fertilizer pollutants in *Aiolopus thalassinus* (Orthoptera: Acrididae) using alkaline comet assay. *Chemosphere* 182:762–770. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.05.082> (Epub 2017 May 16).
- Abreu, M.S., Giacomini, A.C.V., Gusso, D., Rosa, J.G., Koakoski, G., Kalichak, F., Idalêncio, R., Oliveira, T.A., Barcellos, H.H.A., Bonan, C.D., Barcellos, L.J., 2016. Acute exposure to waterborne psychoactive drugs attract zebrafish. *Comp. Biochem. Physiol. C* 179, 37–43.
- Adeel, M., Song, X., Wang, Y., Francis, D., Yang, Y., 2017. Environmental impact of estrogens on human, animal and plant life: a critical review. *Environ. Int.* 99:107–119. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.12.010> (Epub 2016 Dec 29).
- Ali, S.M., Sabae, S.Z., Fayes, M., Monib, M., Hegazi, N.A., 2011. The influence of agro-industrial effluents on river Nile pollution. *J. Adv. Res.* 2 (1), 85–95.
- Amaral, V.C., Santos Gomes, K., Nunes-de-Souza, R.L., 2010 Feb. Increased corticosterone levels in mice subjected to the rat exposure test. *Horm. Behav.* 57 (2):128–133. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2009.09.018> (Epub 2009 Oct 3).
- American Public Health Association (APHA), 1997. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 20 ed. APHA, AWWA, WPCR, New York, p. 1194.
- Anisman, H., Hayley, S., Kelly, O., Borowski, T., Merali, Z., 2001. Psychogenic, neurogenic, and systemic stressor effects on plasma corticosterone and behavior: mouse strain dependent outcomes. *Behav. Neurosci.* 115 (2), 443–454.
- Apfelbach, R., Blanchard, C.D., Blanchard, R.J., Hayes, R.A., McGregor, I.S., 2005. The effects of predator odors in mammalian prey species: a review of field and laboratory studies. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 29, 1123–1144.
- Bai, S.H., Ogbourne, S., 2016. Eco-toxicological effects of the avermectin family with a focus on abamectin and ivermectin. *Chemosphere* 154, 204–214.
- Balmuri, S.R., Selvaraj, U., Kumar, V.V., Anthony, S.P., Tsatsakis, A.M., Golokhvast, K.S., Raman, T., 2017 Jan. Effect of surfactant in mitigating cadmium oxide nanoparticle toxicity: implications for mitigating cadmium toxicity in environment. *Environ. Res.* 152:141–149. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2016.10.005> (Epub 2016 Oct 20).

- Barata-Silva, C., Mitri, S., Pavesi, T., Saggiaro, E., Costa, J.M., 2004. Benzeno: reflexos sobre a saúde pública, presença ambiental e indicadores biológicos utilizados para a determinação da exposição. *Cadernos Saúde Coletiva* 22 (4), 329–342.
- Basso, D.M., Fisher, L.C., Anderson, A.J., Jakeman, L.B., McTigue, D.M., Popovich, P.G., 2006. Basso Mouse Scale for locomotion detects differences in recovery after spinal cord injury in five common mouse strains. *J. Neurotrauma* 23:635–659. <https://doi.org/10.1089/neu.2006.23.635>.
- Berton, F., Vogel, E., Belzung, C., 1998. Modulation of mice anxiety in response to cat odor as a consequence of predators diet. *Physiol. Behav.* 65 (2), 247–254.
- Blanchard, D.C., Blanchard, R.J., 1988. Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. *Annu. Rev. Psychol.* 39, 43–68.
- Blanchard, D.C., Li, C.I., Hubbard, D., Markham, C.M., Yang, M., Takahashi, L.K., et al., 2003. Dorsal premammillary nucleus differentially modulates defensive behaviors induced by different threat stimuli in rats. *Neurosci. Lett.* 345, 145–148.
- Boxall, A.B.A., 2004. The environmental side effects of medication. *EMBO Rep.* 5 (12), 1110–1116.
- Brasil, 2004. Portaria N.º 518, de 25 de Março de 2004. Norma de qualidade de água para consumo humano. Ministério da Saúde.
- Bridi, D., Altenhofen, S., Gonzalez, J.B., Reolon, G.K., Bonan, C.D., 2017. Glyphosate and Roundup® alter morphology and behavior in zebrafish. *Toxicology* <https://doi.org/10.1016/j.tox.2017.10.007> [Epub ahead of print]. pii: S0300-483X(17)30312-8.
- Canteras, N.S., Chiavegatto, S., Ribeiro do Valle, L.E., Swanson, L.W., 1997. Severe reduction of defensive behavior to a predator by discrete hypothalamic chemical lesions. *Brain Res. Bull.* 44, 297–305.
- Canteras, N.S., Kroon, J.A., Do-Monte, F.H., Pavesi, E., Carobrez, A.P., 2008. Sensing danger through the olfactory system: the role of the hypothalamic dorsal premammillary nucleus. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 32 (7), 1228–1235.
- Cardoso-Verá, J.D., Islas-Flores, H., SanJuan-Reyes, N., Montero-Castro, E.I., Galar-Martínez, M., García-Medina, S., Elizalde-Velázquez, A., Dublán-García, O., Gómez-Oliván, L.M., 2017. Comparative study of diclofenac-induced embryotoxicity and teratogenesis in *Xenopus laevis* and *Lithobates catesbeianus*, using the frog embryo teratogenesis assay: *Xenopus* (FETAX). *Sci. Total Environ.* 574:467–475. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.09.095> (Epub 2016 Oct 14).
- Carola, V., D'Olimpio, F., Brunamonti, E., Mangia, F., Renzi, P., 2002. Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behaviour in inbred mice. *Behav. Brain Res.* 134 (1–2), 49–57.
- Carpenter, S., Caraco, N.F., Correl, D.L., Howarth, R.W., Sharpley, N.A., Smith, V.H., 1998. Nonpoint pollution of surface waters with phosphorus and nitrogen. *Issues in Ecology* (3), 1–14.
- Cezario, A.F., Ribeiro-Barbosa, E.R., Baldo, M.V., Canteras, N.S., 2008. Hypothalamic sites responding to predator threats—the role of the dorsal premammillary nucleus in unconditioned and conditioned antipredatory defensive behavior. *Eur. J. Neurosci.* 28 (5), 1003–1015.
- Cheng, S.B., Kuchiwa, S., Nagatomo, I., Akasaki, Y., Uchida, M., Tominaga, M., Hashiguchi, W., Kuchiwa, T., Nakagawa, S., 2002 Mar 29. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin treatment induces c-Fos expression in the forebrain of the Long-Evans rat. *Brain Res.* 931 (2), 176–180.
- China, C.R., Ndaró, M.S., 2015. A study on leather sector investment status in Tanzania. *Afr. J. Sci. Res.* 6, 19–22.
- Clotfelter, E.D., Bell, A.M., Levering, K.R., 2004. The role of animal behavior in the study of endocrine-disrupting chemicals. *Anim. Behav.* 68, 665–676.
- Daughton, C.G., Ruhoy, I.S., 2009. Environmental footprint of pharmaceuticals: the significance of factors beyond direct excretion to sewers. *Environ. Toxicol. Chem.* 28 (12), 2495–2521.
- Deblonde, T., Cossu-Leguille, C., Hartemann, P., 2011. Emerging pollutants in wastewater: a review of the literature. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 214 (6), 442–448.
- Deng, H., Chai, L., Luo, P., Zhou, M., Nover, D., Zhao, X., 2017 Sep. Toxic effects of NH₄⁺-N on embryonic development of *Bufo gargarizans* and *Rana chensinensis*. *Chemosphere* 182:617–623. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.02.156> (Epub 2017 Apr 3).
- Duke, S.O., Powles, S.B., 2008. Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. *Pest Manag. Sci.* 64, 319–325.
- Ecobichon, D.J., 2001. Pesticide use in developing countries. *Toxicology* 160 (1–3), 27–33.
- Estrela, F.N., Rabelo, L.M., Vaz, B.G., de Oliveira Costa, D.R., Pereira, I., de Lima Rodrigues, A.S., Malafaia, G., 2017. Short-term social memory deficits in adult female mice exposed to tannery effluent and possible mechanism of action. *Chemosphere* 184, 148–158.
- Fageria, N.K., Baligar, V.C., 2005. Enhancing nitrogen use efficiency in crop plants. *Adv. Agron.* 88, 97–185.
- Flippin, J.L., Huggett, D., Foran, C.N., 2007. Changes in the timing of reproduction following chronic exposure to ibuprofen in Japanese medaka, *Oryzias latipes*. *Aquat. Toxicol.* 81 (1), 73–78.
- Foley, J.A., Ramankutty, N., Braumn, K.A., Cassidy, E.S., Gerber, J.S., Johnston, M., Mueller, N.D., O'Connell, C., Ray, D.K., West, P.C., Balzer, C., Bennett, E.M., Carpenter, S.R., Hill, J., Monfreda, C., Polasky, S., Rockström, J., Sheehan, J., Siebert, S., Tilman, D., Zaks, D.P.M., 2011. Solutions for a cultivated planet. *Nature* 478, 337–342.
- Frings, H., Frings, M., Kivert, A., 1951. Behavior patterns of the laboratory mouse under auditory stress. *J. Mammal.* 32, 60–76.
- Godfray, H.C., Beddington, J.R., Crute, I.R., Haddad, L., Lawrence, D., Muir, J.F., Pretty, J., Robinson, S., Thomas, S.M., Toulmin, C., 2010. Food security: the challenge of feeding 9 billion people. *Science* 327 (5967), 812–818.
- Graeff, F.G., 1994. Neuroanatomy and neurotransmitter regulation of defensive behaviors and related emotions in mammals. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 27 (4), 811–829.
- Greene, T.M., Redding, C.L., Birkett, M.A., 2014. Effects of rat visual, olfactory, or combined stimuli during cohousing on stress-related physiology and behavior in C57BL/6Ncrl mice. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 53 (6), 647–652.
- Guimarães, A.T., Ferreira, R.O., Rabelo, L.M., Silva, B.C., de Souza, J.M., da Silva, W.A., de Menezes, I.P., Rodrigues, A.S., Vaz, B.G., de Oliveira Costa, D.R., Pereira, I., da Silva, A.R., Malafaia, G., 2016. The C57BL/6J mice offspring originated from a parental generation exposed to tannery effluents shows object recognition deficits. *Chemosphere* 164:593–602. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.08.144> (Epub 2016 Sep 13).
- Hacquemand, R., Lacquot, L., Brand, G., 2010. Comparative fear-related behaviors to predator odors (TMT and natural fox feces) before and after intranasal ZnSO₄ treatment in mice. *Front. Behav. Neurosci.* 4 (188).
- Hansen, B., Kristensen, E.S., Grant, R., Høgh-Jensen, H., Simmelsgaard, S.F., Olesen, J.R., 2000. Nitrogen leaching from conventional versus organic farming systems – a systems modeling approach. *Eur. J. Agron.* 13 (1), 65–82.
- Hecnar, S.J., 1995. Acute and chronic toxicity of ammonium nitrate fertilizer to amphibians from southern Ontario. *Environ. Toxicol. Chem.* 14 (12), 2131–2137.
- Hoeger, B.A., Köllner, B., Dietrich, D.R., Hitzfeld, B., 2005. Water-borne diclofenac affects kidney and gill integrity and selected immune parameters in brown trout (*Salmo trutta* f. fario). *Aquat. Toxicol.* 75 (1), 53–64.
- Holtorf, K., 2009. The bioidentical hormone debate: are bioidentical hormones (estradiol, estrinol, and progesterone) safer or more efficacious than commonly used synthetic versions in hormone replacement therapy? *Postgrad. Med.* 121 (1):73–85. <https://doi.org/10.3810/pgm.2009.01.1949>.
- Huang, H., Wang, X., Ou, W., Zhao, J., Shao, Y., Wang, L., 2003. Acute toxicity of benzene derivatives to the tadpole (*Rana japonica*) and QSAR analyses. *Chemosphere* 53, 963–970.
- Jardim, W.F., Montagner, C.C., Pescara, I.C., Umbuzeiro, G.A., Di Dea Bergamasco, A.M., Eldridge, M.L., et al., 2012. An integrated approach to evaluate emerging contaminants in drinkingwater. *Sep. Purif. Technol.* 84, 3–8.
- Johnson, J., Wu, V., Donovan, M., Majumdar, S., Rentería, R.C., Porco, T., Van Gelder, R.N., Copenhagen, D.R., 2010. Melanopsin-dependent light avoidance in neonatal mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107 (40):17374–17378. <https://doi.org/10.1073/pnas.1008531107> (Epub 2010 Sep 20).
- Kaluff, A.V., Tuohimaa, P., 2005. The grooming analysis algorithm discriminates between different levels of anxiety in rats: potential utility for neurobehavioral stress research. *J. Neurosci. Methods* 143, 169–177.
- Kanda, R., Griffin, P., James, H.A., Fothergill, J., 2003. Pharmaceutical and personal care products in sewage treatment works. *J. Environ. Monit.* 5 (5), 823–830.
- Kavaliers, M., Choleris, E., 2001. Antipredator responses and defensive behavior: ecological and ethological approaches for the neurosciences. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 5 (7–8), 577–586.
- Kobayakawa, K., Kobayakawa, R., Matsumoto, H., Oka, Y., Imai, T., Ikawa, M., Okabe, M., Ikeda, T., Itohara, S., Kikusui, T., Mori, K., Sakano, H., 2007. Innate versus learned odour processing in the mouse olfactory bulb. *Nature* 450, 503–508.
- Korte, S.M., 2001. Corticosteroids in relation to fear, anxiety and psychopathology. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 25, 117–142.
- Kunwar, P., Zelikowky, M., Remedios, R., Cai, H., Yilmaz, M., Meister, M., Anderson, D.J., 2015. Ventromedial hypothalamic neurons control a defensive emotion state. *eLife* 4, e06633.
- Lasota, J.A., Dybas, R.A., 1990. Abamectin as a pesticide for agricultural use. *Acta Leidensia* 59 (1–2), 217–225.
- Lu, C., Tian, H., 2017. Global nitrogen and phosphorus fertilizer use for agriculture production in the past half century: shifted hot spots and nutrient imbalance. *Earth Syst. Sci. Data* 9 (1), 181.
- Macé, E., Caplette, R., Marre, O., Sengupta, A., Chaffiol, A., Barbe, P., Desrosiers, M., Bamberg, E., Sahel, J.A., Picaud, S., Duebel, J., Dalkara, D., 2015 Jan. Targeting Channelrhodopsin-2 to ON-bipolar cells with vitreally administered AAV restores ON and OFF visual responses in blind mice. *Mol. Ther.* 23 (1), 7–16.
- Malafaia, G., Estrela, D.C., Silva, W.A.M., Guimarães, A.T.B., Mendes, B.O., Rodrigues, A.S.L., IPP, Menezes, 2015. Toxicity study in mice fed with corn produced in soil containing tannery sludge vermicompost and irrigated with domestic wastewater. *Curr. Sci.* 109 (7), 1326–1332.
- Markham, C.M., Blanchard, D.C., Canteras, N.S., Cuyno, C., Blanchard, R.J., 2004. Modulation of predatory odor processing following lesions to the dorsal premammillary nucleus. *Neurosci. Lett.* 372, 22–26.
- Martinez, R.C.R., Carvalho-Netto, E.F., Amaral, V.C.S., Nunes-de-Souza, R.L., Canteras, N.S., 2008. Investigation of the hypothalamic defensive system in the mouse. *Behav. Brain Res.* 192, 185–190.
- Mendes, B.O., Rabelo, L.M., Silva, B.C., de Souza, J.M., da Silva Castro, A.L., da Silva, A.R., de Lima Rodrigues, A.S., Malafaia, G., 2017. Mice exposure to tannery effluents changes their olfactory capacity, and their response to predators and to the inhibitory avoidance test. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 24 (23):19234–19248. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9504-5> (Epub 2017 Jun 30).
- Mennigen, J.A., Zamora, J.M., Chang, J.P., Trudeau, V.L., 2017. Endocrine disrupting effects of waterborne fluoxetine exposure on the reproductive axis of female goldfish, *Carassius auratus*. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 202:70–78. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2017.08.003> (Epub 2017 Aug 16).
- Montalvão, M.F., Malafaia, G., 2017. Effects of abamectin on bullfrog tadpoles: insights on cytotoxicity. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 24 (29):23411–23416. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0124-x> (Epub 2017).
- Montalvão, M.F., de Souza, J.M., Guimarães, A.T.B., de Menezes, I.P.P., da Silva Castro, A.L., de Lima Rodrigues, A.S., Malafaia, G., 2017. The genotoxicity and cytotoxicity of tannery effluent in bullfrog (*Lithobates catesbeianus*). *Chemosphere* 183, 491–502.
- Montalvão, M.F., da Silva Castro, A.L., de Lima Rodrigues, A.S., de Oliveira Mendes, B., Malafaia, G., 2018. Impacts of tannery effluent on development and morphological characters in a neotropical tadpole. *Sci. Total Environ.* 610–611:1595–1606. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.06.134> (Epub 2017 Jun 23).

- Mortatti, J., Vendramini, D., De Oliveira, H., 2012. Avaliação da poluição doméstica fluvial na zona urbana do município de Piracicaba, SP, Brasil. *Ambiente Água* 7 (2), 110–119.
- de Moura, F.R., da Silva Lima, R.R., da Cunha, A.P.S., da Costa Marisco, P., Aguiar, D.H., Sugui, M.M., Sinhorin, A.P., VDG, Sinhorin, 2017. Effects of glyphosate-based herbicide on pintado da Amazônia: hematology, histological aspects, metabolic parameters and genotoxic potential. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 56:241–248. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2017.09.019> [Epub ahead of print].
- Noorhosseini, S.A., Allahyari, M.S., Damalas, C.A., Moghaddam, S.S., 2017. Public environmental awareness of water pollution from urban growth: the case of Zarjub and Goharrud rivers in Rasht, Iran. *Sci Total Environ.* 599–600:2019–2025. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.05.128> (Epub 2017 May 23).
- Novelli, A., Vieira, B.H., Cordeiro, D., Cappelini, L.T., Vieira, E.M., Espíndola, E.L., 2012 Jan. Lethal effects of abamectin on the aquatic organisms *Daphnia similis*, *Chironomus xanthus* and *Danio rerio*. *Chemosphere* 86 (1):36–40. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.08.047> (Epub 2011 Sep 28).
- Odermatt, A., Gumy, C., 2008. Glucocorticoid and mineralocorticoid action: why should we consider influences by environmental chemicals? *Biochem. Pharmacol.* 76 (10): 1184–1193. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2008.07.019> (Epub 2008 Jul 23).
- de Oliveira-Crisanto, K., de Andrade, W.M., de Azevedo Silva, K.D., Lima, R.H., de Oliveira Costa, M.S., de Souza Cavalcante, J., de Lima, R.R., do Nascimento Jr., E.S., Cavalcante, J.C., 2015. The differential mice response to cat and snake odor. *Physiol. Behav.* 152 (Pt A):272–279. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2015.10.013> (Epub 2015 Oct 22).
- Östman, M., Lindberg, R.H., Fick, J., Björn, E., Tyksklind, M., 2017. Screening of biocides, metals and antibiotics in Swedish sewage sludge and wastewater. *Water Res.* 115: 318–328. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.03.011> (Epub 2017 Mar 6).
- Pamplona, J.H., Oba, E.T., Da Silva, T.A., Ramos, L.P., Ramsdorf, W.A., Cestari, M.M., ... de Assis, H.S., 2011. Subchronic effects of dipyrone on the fish species *Rhamdia quelen*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74 (3), 342–349.
- Perez-Gonzalez, E., Osuna-Martinez, U.G., Herrera-Moreno, M.N., Rodriguez-Meza, G.D., Gonzalez-Ocampo, H.A., Bucio-Pacheco, M., 2017. Organochlorine pesticides in gonad, brain, and blood of mice in two agricultural areas of Sinaloa. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 98 (4), 454–459.
- Perreault, H.A., Semsar, K., Godwin, J., 2003. Fluoxetine treatment decreases territorial aggression in a coral reef fish. *Physiol. Behav.* 79 (4), 719–724.
- Peruzzo, P.J., Porta, A.A., Ronco, A.E., 2008. Levels of glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in north pampasic region of Argentina. *Environ. Pollut.* 156, 61–66.
- Polosukhina, A., Litt, J., Tochitsky, I., Nemargut, J., Sychev, Y., De Kouchkovsky, I., Huang, T., Borges, K., Trauner, D., Van Gelder, R.N., Kramer, R.H., 2012 Jul 26. Photochemical restoration of visual responses in blind mice. *Neuron* 75 (2):271–282. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.05.022>.
- Prut, L., Belzung, C., 2003. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur. J. Pharmacol.* 463 (1–3), 3–33.
- Rabelo, L.M., Silva, B.C., Almeida, S.F., Silva, WAM, Oliveira M.B., Guimarães, A.T.B., Silva, A.R., Castro, A.L.S., Rodrigues, A.S.L., Malafaia, G., 2016. Memory deficit in Swiss mice exposed to tannery effluent. *Neurotoxicol. Teratol.* 55, 45–49.
- Rocha, O.P., de-Oliveira, D.P., 2017. Investigation of a Brazilian tannery effluent by means of zebra fish (*Danio rerio*) embryo acute toxicity (FET) test. *J. Toxic. Environ. Health A* 80 (19–21), 1078–1085.
- Sabumon, P.C., 2016. Perspectives on biological treatment of tannery effluent. *Adv. Recycl. Waste Manag.* 1, 3–10.
- Scheibel, J.J., 2004. The evolution of anionic surfactant technology to meet the requirements of the laundry detergent industry. *J. Surfactant Deterg.* 7 (4), 319–328.
- Schwerdtfeger, R.M.H., Menard, J.L., 2008. The lateral hypothalamus and anterior hypothalamic nucleus differentially contribute to rat's defensive responses in the elevated plus-maze and shock-probe burying tests. *Physiol. Behav.* 93, 697–705.
- Singla, N., Kaur, R., 2014. Potential of citronella oil as rodent repellent measured as aversion to food. *Appl. Biol. Res.* 16 (2), 191–198.
- Sodré, F.F., Locatelli, M.A.F., Jardim, W.F., 2010. Occurrence of emerging contaminants in Brazilian drinking waters: a sewage-to-tap issue. *Water Air Soil Pollut.* 206 (1), 57–67.
- Souza, J.M., Montalvão, M.F., da Silva, A.R., de Lima Rodrigues, A.S., Malafaia, G., 2017. A pioneering study on cytotoxicity in Australian parakeets (*Melopsittacus undulatus*) exposed to tannery effluent. *Chemosphere* 175, 521–533.
- Tarazona, J.V., Tiramani, M., Reich, H., Pfeil, R., Istace, F., Crivellente, F., 2017. Glyphosate toxicity and carcinogenicity: a review of the scientific basis of the European Union assessment and its differences with IARC. *Arch. Toxicol.* 91 (8), 2723–27431.
- Ternes, T.A., 1998. Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water Res.* 32 (11), 3245–3260.
- Ternes, T., Bonerz, M., Schmidt, T., 2001. Determination of neutral pharmaceuticals in wastewater and rivers by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr.* 938 (1), 175–185.
- Tilman, D., Cassman, K.G., Matsons, P.A., Naylor, R., Polasky, S., 2002. Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature* 418, 671–677.
- Topal, A., Atamanalp, M., Oruç, E., Halici, H.B.H., Şişecioglu, M., Erol, H.S., Gergit, A., Yilmaz, B., 2015. Neurotoxic effects of nickel chloride in the rainbow trout brain: assessment of c-Fos activity, antioxidant responses, acetylcholinesterase activity, and histopathological changes. *Fish Physiol. Biochem.* 41 (3), 625–634.
- Trexler, E.T., Smith-Ryan, A.E., Norton, L.E., 2014. Metabolic adaptation to weight loss: implications for the athlete. *J. Int. Soc. Sports Nutr.* 11 (1):7. <https://doi.org/10.1186/1550-2783-11-7>.
- Vasconcelos, A.M., Daam, M.A., dos Santos, L.R., Sanches, A.L., Araújo, C.V., Espíndola, E.L., 2016. Acute and chronic sensitivity, avoidance behavior and sensitive life stages of bullfrog tadpoles exposed to the biopesticide abamectin. *Ecotoxicology* 25 (3): 500–509. <https://doi.org/10.1007/s10646-015-1608-4> (Epub 2016 Jan 12).
- Vianna, D.M., Borelli, K.G., Ferreira-Netto, C., Macedo, C.E., Brandão, M.L., 2003. Fos-like immunoreactive neurons following electrical stimulation of the dorsal periaqueductal gray at freezing and escape thresholds. *Brain Res. Bull.* 62, 179–189.
- Wang, L., Chen, I.Z., Lin, D., 2015. Collateral pathways from the ventromedial hypothalamus mediate defensive behaviors. *Neuron* 85, 1344–1358.
- Weldon, P.J., Divita, F.M., Middendorf, G.A., 1987. Responses to snake odors by laboratory mice. *Behav. Process.* 14 (2):137–146. [https://doi.org/10.1016/0376-6357\(87\)90040-4](https://doi.org/10.1016/0376-6357(87)90040-4).
- Woodburn, A.T., 2000. Glyphosate: production, pricing and use worldwide. *Pest Manag. Sci.* 56 (4), 309–312.
- Xu, Z., Zhang, X., Xie, J., Yaun, G., Xinzhai, Tang, Sun, X., Yu, G., 2014. Total nitrogen concentrations in surface water of typical agro-and forest ecosystems in China, 2004–2009. *PLoS One* 9 (3), e92850.
- Yousef, H.A., Abdelfattah, E.A., Augustyniak, M., 2017. Evaluation of oxidative stress biomarkers in *Aiolopus thalassinus* (Orthoptera: Acrididae) collected from areas polluted by the fertilizer industry. *Ecotoxicology* 26 (3):340–350. <https://doi.org/10.1007/s10646-017-1767-6> (Epub 2017 Jan 23).
- Zhou, Z., Yang, J., Chan, K.M., 2017. Toxic effects of triclosan on a zebrafish (*Danio rerio*) liver cell line, ZFL. *Aquat. Toxicol.* 191:175–188. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.08.009> (Epub 2017 Aug 19).