



Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Urutaí  
Programa de Pós-Graduação em Conservação de  
Recursos Naturais do Cerrado

**DIAZEPAM EM CONCENTRAÇÃO  
AMBIENTAL ALTERA COMPORTAMENTO  
EM *Betta splendens***

**CAMILA ALVES LOPES CAMBRÉA**

**Orientador: Prof. Dr. André Luis da Silva Castro**

Urutaí, 29 de maio de 2019



**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 Luis da Silva Castro

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

*Coordenador*

Prof. Dr. Ivandilson Pessoa Pinto de Menezes

Urutaí, 29 de maio de 2019

**CAMILA ALVES LOPES CAMBRÉA**

**DIAZEPAM EM CONCENTRAÇÃO AMBIENTAL ALTERA  
COMPORTAMENTO EM *BETTA SPLENDENS***

*Orientador*

Prof. Dr. André Luis da Silva Castro

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.

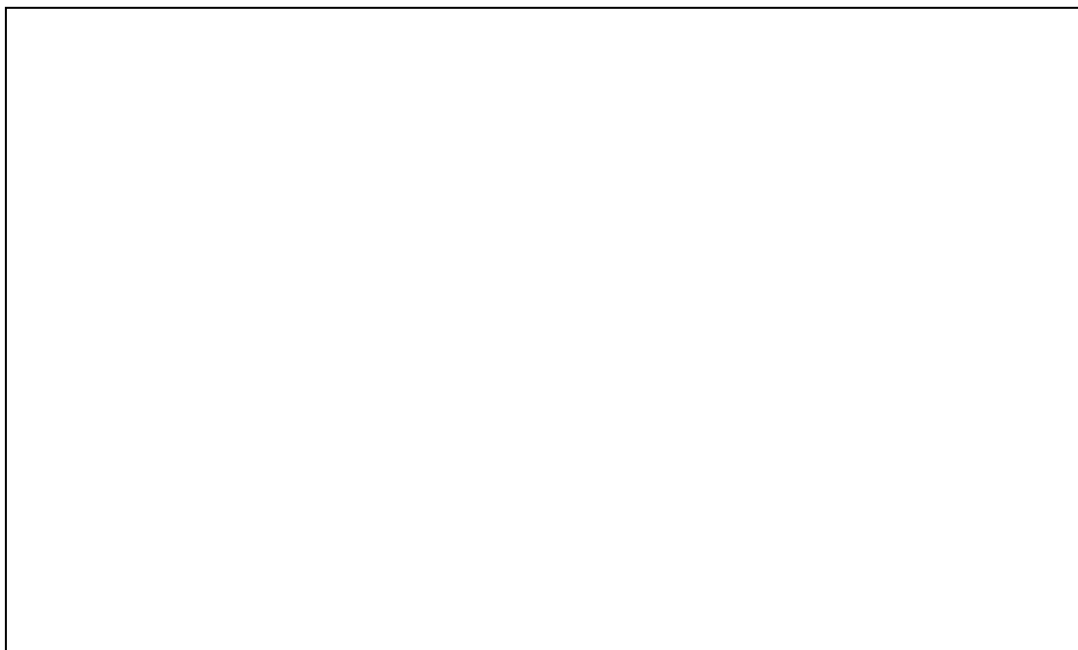
**URUTAÍ (GO)  
2019**

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 – SIB/IF Goiano





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

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

**Identificação da Produção Técnico-Científica**

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

Nome Completo do Autor: Camila Alves Lopes Cambréa

Matrícula: 2017101330940158

Título do Trabalho: Diazepam em concentração ambiental altera comportamento em *Betta splendens*

**Restrições de Acesso ao Documento**

Documento confidencial:  Não  Sim, justifique: \_\_\_\_\_

Informe a data que poderá ser disponibilizado no RIIF Goiano: 05/06/2020

O documento está sujeito a registro de patente?  Sim  Não

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

**DECLARAÇÃO DE DISTRIBUIÇÃO NÃO-EXCLUSIVA**

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

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

Urutá \_\_\_\_\_ 05/06/2019  
Local Data

Assinatura do Autor e/ou Detentor dos Direitos Autorais

Ciente e de acordo:

Assinatura do(a) orientador(a)



## ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº 036

Ata da 36ª Sessão Pública de Defesa de Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Conservação de Recursos Naturais do Cerrado do Instituto Federal Goiano – Campus Urutai. Aos 29 dias do mês de maio de 2019, às 07:30h, reuniram-se na Sala da Pós-Graduação do Instituto Federal Goiano – Campus Urutai, a Banca Examinadora composta pelos Professores **Carla Cristina Braz Louly**, **Guilherme Malafaia** e **André Luis da Silva Castro** (orientador do trabalho), sob a presidência deste último, para avaliação da apresentação da mestranda **Camila Alves Lopes Cambréa** e de sua dissertação intitulada “**Concentração ambiental de diazepam altera comportamento de *Betta splendens*.**” Aberta a sessão pelo(a) Presidente da Banca, coube a candidata, na forma regimental, realizar a exposição de seu trabalho, dentro do tempo regulamentar, sendo em seguida questionada pelos membros da banca examinadora, tendo dado as explicações que foram necessárias. A banca examinadora, em caráter sigiloso, após análise e julgamento final, concluiu por:

- Aprovar a dissertação sem alterações
- Aprovar a dissertação com modificações (vide verso em caso de alteração do título)
- Reprovar a dissertação

A apresentação e aprovação da dissertação é requisito parcial para a concessão do grau de **MESTRA EM CONSERVAÇÃO DE RECURSOS NATURAIS DO CERRADO**, tendo a candidata ciência de que o título de **MESTRA** só será concedido depois de atendidas as exigências feitas pela Banca Examinadora, bem como das demais exigências estabelecidas no Regulamento do Programa de Pós-graduação em Conservação de Recursos Naturais do Cerrado. A partir da presente data, a aluna terá o prazo de 60 dias para efetuar as alterações exigidas pela banca e entregar o volume da Dissertação corrigido, assinado pela banca e acompanhado de toda a **documentação pertinente à abertura do processo de solicitação de diploma**. Nada mais havendo a tratar, a sessão foi encerrada às 10:09, sendo lavrada a presente Ata, que uma vez **aprovada**, foi assinada por todos os membros da Banca Examinadora e pela aluna.

Urutai, 29 de maio de 2019.

Prof. Dr. André Luis da Silva Castro  
Prof. Dra. Carla Cristina Braz Louly  
Prof. Dr. Guilherme Malafaia  
Camila Alves Lopes Cambréa

Por sugestão da Banca Examinadora, o novo título passa a ser:

Diazepam em concentração ambiental altera comportamento em *Betta splendens*

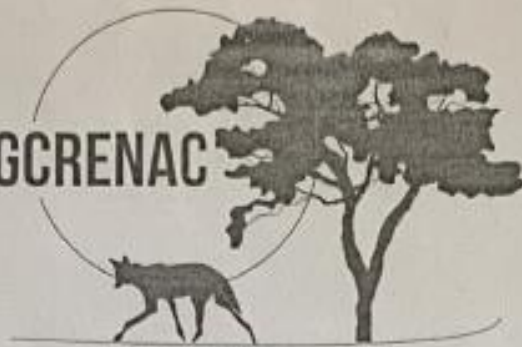
---

---

---

---

PPGCRENAC



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

## FICHA DE APROVAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

|                        |                                                                                       |
|------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| Título da dissertação: | <i>Diagnose em conservação ambiental altera composição em <u>Cotta splendens</u>.</i> |
| Orientador:            | Prof. Dr. André Luis da Silva Castro                                                  |
| Autora:                | Camila Alves Lopes Cambrea                                                            |

Dissertação de Mestrado APROVADA em 29 de maio de 2019, 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. André Luis da Silva Castro  
Instituto Federal Goiano – Campus Urutai  
Presidente

Prof. Dra. Carla Cristina Braz Louly  
Instituto Federal Goiano – Campus Urutai  
Membro titular

Prof. Dr. Guilherme Malafaia  
Instituto Federal Goiano – Campus Urutai  
Membro titular



*“O sucesso nasce do querer, da  
determinação e persistência em se chegar a  
um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo,  
quem busca e vence obstáculos,  
no mínimo fará coisas admiráveis.”*  
*(José de Alencar)*

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus pela força, saúde, sabedoria e por colocar pessoas tão especiais no meu caminho.

Ao Instituto Federal Goiano – Campus Urutaí, que me proporcionou desenvolvimento acadêmico, profissional e pessoal por meio do Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais do Cerrado.

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

Aos professores do PPG-CRENAC, aos colegas de curso e às colaboradoras, Lúcia e Adriene, pelo companheirismo e cooperação.

Ao meu marido Rui pelo companheirismo, dedicação, paciência e carinho. Obrigada pela compreensão nos momentos de estresse e de mau humor. Seu amor e seus conselhos me deram forças para que eu permanecesse nesta caminhada.

Aos meus pais, Solange e Wagner, que não mediram esforços para que esse sonho se tornasse realidade, sempre com muito amor e carinho.

Às minhas irmãs, Luana e Daniela, que sempre acreditaram e incentivaram a realização de todos os meus sonhos.

Aos amigos do Laboratório de Zoologia do Instituto Federal Goiano - Campus Urutaí (Caroliny, Gercino, Marcelo, Sindoval, Daniele e Juliene) por todo carinho, apoio, ensinamentos, conselhos, conversas e colaboração nesse trabalho.

Ao Diêgo Alberto Teodoro, ex-colega de laboratório, pela ajuda, principalmente, com a estatística.

Ao coordenador do Laboratório de Pesquisas Biológicas, Prof. Dr. Guilherme Malafaia por disponibilizar o medidor multiparâmetro e, principalmente, por sua prontidão em compartilhar conhecimento para a conclusão desse trabalho.

Às professoras Adriana da Silva Santos e Maria Angélica Gonçalves de Araújo, colegas de trabalho e amigas, pela amizade, prestatividade e infinitas consultorias a respeito de tudo.

Ao coordenador do curso de Medicina Veterinária do Instituto Federal Goiano – Campus Urutaí, Prof. Dr. Wesley José de Souza, e demais colegas de trabalho (Nilma Gonçalves, Adriana da Silva, Maria Angélica Gonçalves, Daniel Barbosa, Carla Louly, Maria Alice Pires, José Roberto Ferreira, Márcio Eduardo Pereira, Carolina Osava, Pedro Borges, Hugo Peron, Carla Faria, Sabrina Freitas e Saulo Humberto) por permitir e incentivar o desenvolvimento da minha pesquisa e compreender minhas ausências no trabalho.

Ao professor Dr. Guilherme Malafaia e à professora Dra. Carla Louly por terem gentilmente aceito o convite para compor a banca desta dissertação e pelas contribuições.

Ao CNPq pelo financiamento do projeto de pesquisa.

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

## SUMÁRIO

|                                                    |             |
|----------------------------------------------------|-------------|
| <b>LISTA DE FIGURAS E TABELA.....</b>              | <b>XII</b>  |
| <b>RESUMO.....</b>                                 | <b>XIII</b> |
| <b>ABSTRACT.....</b>                               | <b>XIV</b>  |
| <b>1. INTRODUÇÃO.....</b>                          | <b>1</b>    |
| <b>2. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>                  | <b>3</b>    |
| 2.1. Modelo experimental.....                      | 3           |
| 2.2. Design experimental.....                      | 4           |
| 2.3. Concentrações e administração do fármaco..... | 5           |
| 2.4. Avaliação de parâmetros comportamentais.....  | 5           |
| 2.4.1. Comportamento alimentar.....                | 5           |
| 2.4.2. Atividade locomotora.....                   | 6           |
| 2.4.3. Agressividade.....                          | 6           |
| 2.4.4. Ansiedade.....                              | 7           |
| 2.5. Análise estatística.....                      | 9           |
| 2.6. Questões éticas.....                          | 9           |
| <b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>              | <b>9</b>    |
| 3.1. Comportamento alimentar.....                  | 9           |
| 3.2. Atividade locomotora.....                     | 11          |
| 3.3. Agressividade.....                            | 13          |
| 3.4. Ansiedade.....                                | 15          |
| <b>4. CONCLUSÃO.....</b>                           | <b>18</b>   |
| <b>5. REFERÊNCIAS.....</b>                         | <b>19</b>   |

## LISTA DE FIGURAS E TABELA

|                                                                                                                                                                                                                                               |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1-</b> Cronograma do experimento.....                                                                                                                                                                                               | 4  |
| <b>Figura 2-</b> Esquema dos aquários para avaliar o comportamento alimentar.....                                                                                                                                                             | 5  |
| <b>Figura 3-</b> Esquema dos aquários com os quadrantes na parede frontal para avaliar atividade locomotora.....                                                                                                                              | 6  |
| <b>Figura 4-</b> Esquema do teste do espelho para avaliar a agressividade.....                                                                                                                                                                | 7  |
| <b>Figura 5-</b> Esquema do tanque de teste de campo aberto para avaliar o comportamento de tigmotaxia.....                                                                                                                                   | 8  |
| <b>Figura 6-</b> Esquema da arena teste de preferência claro/escuro para avaliar o comportamento de escototaxia.....                                                                                                                          | 8  |
| <b>Tabela 1-</b> Parâmetros físico-químicos da água dos aquários durante o experimento.....                                                                                                                                                   | 9  |
| <b>Figura 7-</b> Latência (em segundos) para captura de alimento nos grupos Controle, Diaz 0,88 µg/L e Diaz 8,8 µg/L, a 0h (pré-tratamento), 24h, 72h e 120h de exposição.....                                                                | 10 |
| <b>Figura 8-</b> Atividade locomotora dos peixes nos grupos Controle, Diaz 0,88 µg/L e Diaz 8,8 µg/L, a 0h (pré-tratamento), 24h, 72h e 120h de exposição.....                                                                                | 12 |
| <b>Figura 9-</b> Comportamento agressivo dos peixes avaliado pelo teste do espelho durante cinco minutos nos grupos Controle, Diaz 0,88 µg/L e Diaz 8,8 µg/L, a 0h (pré-tratamento), 24h, 72h e 120h de exposição.....                        | 14 |
| <b>Figura 10-</b> Tigmotaxia como comportamento preditivo de ansiedade no teste de campo aberto durante cinco minutos nos grupos Controle, Diaz 0,88 µg/L e Diaz 8,8 µg/L, a 0h (pré-tratamento), 24h, 72h e 120h de exposição.....           | 16 |
| <b>Figura 11-</b> Escototaxia como comportamento preditivo de ansiedade no teste de preferência claro/escuro durante 15 minutos nos grupos Controle, Diaz 0,88 µg/L e Diaz 8,8 µg/L, a 0h (pré-tratamento), 24h, 72h e 120h de exposição..... | 17 |

# DIAZEPAM EM CONCENTRAÇÃO AMBIENTAL ALTERA COMPORTAMENTO EM *Betta splendens*

## RESUMO

A presença de fármacos no ambiente aquático tem sido relatada há alguns anos. No entanto, os impactos sobre os organismos presentes nesses ecossistemas ainda são pouco conhecidos. Assim, investigamos os efeitos da exposição aguda ao diazepam sobre os comportamentos alimentar, locomotor, agressividade e ansiedade em *Betta splendens*. Testes comportamentais foram realizados em todos os peixes antes da exposição ao fármaco, na fase denominada pré-tratamento. Após esse período, os animais foram expostos ao fármaco por cinco dias, período denominado de tratamento, e os mesmos testes foram realizados após 24, 72 e 120h de exposição. Foram utilizados três grupos experimentais: Controle; Diaz 0,88 µg/L (concentração ambiental); e Diaz 8,8 µg/L (concentração 10 vezes maior que a ambiental). Nossos resultados demonstraram que o diazepam na concentração ambiental é capaz de reduzir a agressividade e a ansiedade, ao passo que na concentração 10 vezes maior é capaz de aumentar a atividade locomotora. Peixes com tais alterações comportamentais podem provocar mudanças nas estruturas das comunidades aquáticas, uma vez que influenciam no crescimento e reprodução e, também, aumentam o risco de predação dos organismos expostos. Assim, esses dados sugerem que a presença de fármacos psicoativos, como benzodiazepínicos, em ambientes aquáticos pode causar alterações comportamentais ecologicamente importantes em organismos não-alvos.

**Palavras-chave:** Benzodiazepínicos, medicamento psiquiátrico, peixe, toxicidade.

# **DIAZEPAM IN ENVIRONMENTAL CONCENTRATION CHANGE BEHAVIOR IN *Betta splendens***

## **ABSTRACT**

The presence of drugs in the aquatic environment has been reported for some years. However, the impacts on organisms present in these ecosystems are poorly understood. Thus, we investigated the effects of acute exposure to diazepam on the feeding, locomotor, aggressiveness and anxiety-like behaviors in *Betta splendens*. Behavioral tests were performed on all fish prior to exposure to the drug, designated pre-treatment. After this period, the animals were exposed to the drug for five days, a so-called treatment period, and the tests were performed after 24, 72 and 120 hours of exposure. Three experimental groups were used: Control; Diaz 0.88  $\mu$  /L (environmental concentration); and Diaz 8.8  $\mu$ g/L (concentration 10 times higher than the environmental concentration). Our results demonstrated that diazepam in the environmental concentration is able to reduce aggression and anxiety-like behavior, while in the concentration 10 times greater it is able to increase the locomotor activity. Fish with such behavioral changes can cause changes in the structures of aquatic communities, as they influence growth and reproduction and also increase the risk of predation of exposed organisms. Thus, these data suggest that the presence of psychoactive drugs, such as benzodiazepines, in aquatic ecosystems can cause ecologically important behavioral changes on non-target organisms.

**Keywords:** Benzodiazepines, psychiatric medication, fish, toxicity.

## 1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento tecnológico e o crescimento populacional têm contribuído para o aumento da produção e consumo mundial de medicamentos, tanto para uso em humanos quanto para uso veterinário (Fent et al., 2006). As substâncias ativas dos medicamentos, ou seja, os fármacos são liberados constantemente no ambiente através de fezes e urina de forma conjugada ou não metabolizada e através do descarte de medicamentos vencidos em esgotos domésticos e efluentes de estações de tratamento de esgoto (Subedi & Kannan, 2015; Alygizakis et al., 2016), poluindo o ambiente e causando danos ao ecossistema e à saúde humana (Calisto & Esteves, 2009).

Os primeiros estudos a identificar fármacos como potenciais poluentes ambientais começaram apenas na década de 1990 (Purdom et al., 1994; Desbrow et al., 1998; Routledge et al., 1998). Foram encontrados em concentrações de poucos nanogramas por litro (Halling-Sørensen et al., 1998) em esgoto, em águas superficiais e subterrâneas e até em água tratada para consumo humano, em níveis crescentes em diversos países (Ternes, 1998; Ferrari et al., 2003; Jones et al., 2002; Benotti et al., 2009). Isso contribuiu para que a poluição causada por medicamentos fosse considerada como um problema emergente ambiental e de saúde pública e uma das principais ameaças aos ecossistemas aquáticos, atualmente, em todo o mundo (Carlsson et al., 2006; Brodin et al., 2013).

Os fármacos são construídos para permanecerem biologicamente ativos e resistirem à degradação metabólica. Uma vez administrados, muitos deles podem ser excretados do corpo em suas formas ativas (Calisto & Esteves, 2009). Deste modo, estão sendo introduzidos no ambiente de forma contínua, principalmente por meio de estações de tratamento de esgoto, em consequência de inadequações de processos de tratamento (Gros et al., 2010; Jelic et al., 2011). Uma vez no ambiente, muitos fármacos resistem à degradação biológica e à fotodegradação e apresentam, portanto, potencial de afetar espécies não-alvos (Cardoso et al., 2014; Brandão et al., 2013).

Os fármacos encontrados nos ecossistemas aquáticos pertencem a várias classes farmacoterapêuticas, como hormônios, antibióticos, anti-inflamatórios, antipiréticos, redutores de lipídeos, anticonvulsivos, antidepressivos e ansiolíticos (Calisto & Esteves, 2009). Entre esses compostos, os medicamentos psiquiátricos compõem um grupo de substâncias comumente prescritas em todo o mundo (Fent et al., 2006) e com crescimento no consumo (Bachhuber et al., 2016).



Benzodiazepínicos são compostos pertencentes ao grupo de substâncias psiquiátricas mais prescritas em todo o mundo (Van der Ven et al., 2004). Atuam no sistema nervoso central, nos receptores do tipo GABA, provocando efeitos ansiolíticos, sedativos e hipnóticos (Shader & Greenblatt, 1977). O diazepam é o fármaco mais conhecido deste grupo (Baldessarini, 1996) e tem sido detectado no ambiente em efluentes domésticos, em rios e na água utilizada para abastecimento humano em diferentes partes do mundo (Wu et al., 2015; Van der Ven et al., 2006; Ternes et al., 2001; Kolpin et al., 2002; Yuan et al., 2013; Snyder, 2008).

O diazepam é muito resistente à fotodegradação e não é eliminado no tratamento de efluentes, motivo pelo qual se acumula e persiste em ambiente aquático (Calisto et al., 2011). Na Alemanha esse fármaco foi encontrado em águas superficiais na concentração de 0,88 µg/L (Ternes et al., 2001), a maior já detectada nesse tipo de ambiente (De Abreu et al., 2014). No Brasil foi recentemente detectado no Rio Belém, Curitiba-PR, na concentração de 0,763 µg/L (Böger et al., 2018).

Nas diversas classes de vertebrados os receptores alvos de fármacos podem ser altamente conservados (Gunnarsson et al., 2008; McRobb et al., 2014). Estudos identificaram receptores benzodiazepínicos GABA em peixes e mostraram que eles têm características de ligação semelhantes às dos roedores e humanos (Anzelius et al., 1995; Carr et al., 1999), embora possam ter diferenças funcionais em relação aos mamíferos (Betti et al., 2001). Assim, os medicamentos e princípios ativos para uso em humanos, encontrados nos ambientes aquáticos, apresentam potencial de causar efeitos adversos em peixes e em outros vertebrados (Brown et al., 2014). Os efeitos adversos em peixes causados por medicamentos psiquiátricos, como alterações comportamentais, podem impactar diretamente na sobrevivência e reprodução dos organismos (Scott & Sloman, 2004; Brodin et al., 2013; Brodin et al., 2014).

O comportamento é a manifestação física da resposta fisiológica de um animal ao seu ambiente (Clotfelter et al., 2004) e decisivo para crescimento, reprodução e sobrevivência (Brodin & Johansson, 2004). Portanto, mudanças perceptíveis no comportamento geradas por concentrações subletais de fármacos (Hellou, 2011; Conti et al., 2017) podem influenciar direta ou indiretamente em populações inteiras, bem como o funcionamento do ecossistema aquático (Clotfelter et al., 2004).

Em função de homologia genética com seres humanos (Brown et al., 2014), outros grupos de vertebrados aquáticos, como os peixes, são importantes em estudos toxicológicos para o desenvolvimento de ferramentas de avaliação de risco ambiental e à saúde humana (McRobb et al., 2014; Bolis et al., 2001).

Alguns estudos apontam para potenciais riscos da poluição ambiental por diazepam, causando diferentes efeitos comportamentais em espécies variadas. Em *Danio rerio*, por exemplo, o diazepam pode causar aumento da atividade em embriões (concentração 273 µg/L) (Oggier et al., 2010) e em adultos (0,16 mg/L) (Gebauer et al., 2011). Em *Lepomis gibbosus*, em diversas concentrações deste mesmo fármaco (266 a 4260 µg/L), também se observou aumento de atividade (Brandão et al., 2013). Outro efeito encontrado foi a redução da ansiedade em larvas (Richendrfer et al., 2012) e em adultos de *Danio rerio* (Bencan et al., 2009) em 0,05 e 1,25 mg/L de diazepam, respectivamente.

Embora os estudos supracitados mostrem efeitos comportamentais em peixes expostos ao diazepam, pouco se sabe sobre possíveis implicações desse fármaco em concentrações ambientalmente relevantes (Santos et al., 2010), uma vez que a maioria dos estudos avalia concentrações muito maiores que as ambientais. Assim, é imprescindível avaliar se a concentração ambiental do diazepam pode causar efeitos comportamentais em organismos aquáticos e ainda prever se o aumento da sua concentração pode intensificar os efeitos,

Nesse contexto, nossa hipótese é que a concentração de diazepam encontrada no ambiente pode alterar parâmetros comportamentais em peixes e que o aumento da concentração intensifica as alterações. Assim, testamos o efeito da concentração ambiental de diazepam, e dez vezes superior, no comportamento de machos de *Betta splendens*, os quais apresentam comportamento agressivo (Hogan, 1967; Bronstein, 1985) e são utilizados como modelo biológico em estudos ecotoxicológicos (Clotfelter & Rodriguez, 2006; Clotfelter et al., 2007).

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Modelo experimental**

Foram utilizados 48 machos adultos de *Betta splendens*, adquiridos comercialmente de uma loja de animais de Goiânia-GO. Os peixes foram alojados no laboratório de Zoologia do Instituto Federal Goiano/Campus Urutaí, individualmente e sem contato visual com outros indivíduos por pelo menos 10 dias antes dos testes, em recipientes plásticos transparentes contendo água desclorada. Durante a aclimação e experimento o fotoperíodo foi controlado em 12/12 horas (luminosidade artificial, 1.600 lúmens) e os peixes foram alimentados com 10 *pellets* de ração comercial (Poytara - Premium Betta, nível protéico=35%), divididos em duas vezes ao dia. Os parâmetros físico-químicos da água foram monitorados e durante todo período de aclimação e experimento estiveram adequados para o bem-estar dos animais. O pH,

salinidade e a temperatura foram verificados por meio de um analisador multiparâmetro (ITPH-3000, INSTRUTEMP) e a amônia total determinada usando um teste comercial (Labcon Test, ALCON).

## 2.2. Design experimental

Após a aclimação, os peixes foram transferidos individualmente para aquários de vidro transparente (20 cm de comprimento x 20 cm de altura x 15 cm de largura, 4,5 L de água de torneira desclorada) com paredes posterior e laterais cobertas com plástico azul claro para impedir influência do contato visual com outros indivíduos (Castro et al., 2009).

O design consistiu na formação de três grupos experimentais (n=16): 1) Controle; 2) Diaz 0,88 µg/L, que representa a maior concentração ambiental detectada, conforme Ternes et al. (2001); 3) Diaz 8,8 µg/L, concentração dez vezes maior que a ambiental, para avaliar possíveis efeitos do aumento da concentração deste fármaco no ambiente aquático, em função do lançamento contínuo de resíduos.

Os animais foram aclimatados por 24 horas e, após esse período, receberam os respectivos tratamentos e permaneceram por 120 horas de exposição, conforme Figura 1. Não houve troca de água durante o experimento. Os testes comportamentais foram realizados em quatro momentos: 0h, denominado pré-tratamento, e 24h, 72h e 120h de exposição ao diazepam. O comprimento e peso dos peixes foi contrabalanceado entre os grupos experimentais.

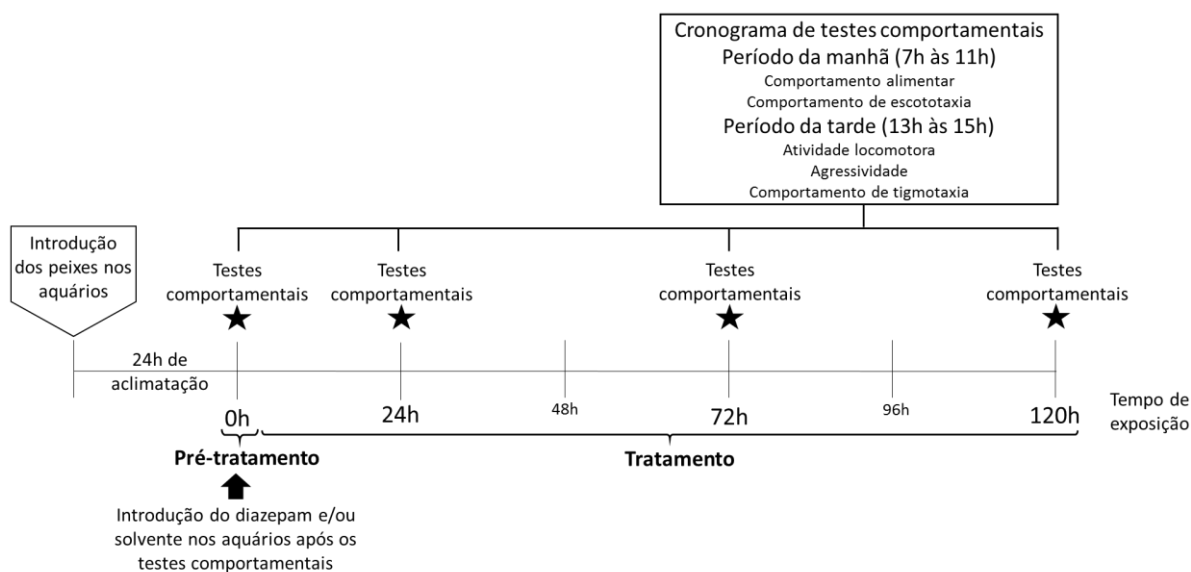


Figura 1. Cronograma do experimento indicando duração da exposição ao diazepam e/ou solvente e período de realização dos testes comportamentais.

### **2.3. Concentrações e administração do fármaco**

Foi utilizado o diazepam (pureza  $\geq 99,9\%$ ; CAS 439-14-5; PHARMANOSTRA), na forma de pó branco cristalino. Para atingir as concentrações nominais na água, o diazepam foi diluído no solvente dimetilsulfóxido (DMSO) (pureza  $\geq 99,9\%$ ; CAS 67-68-5; DINÂMICA) a uma concentração final de 0,01% vol/vol. No grupo controle a mesma concentração de DMSO utilizada como solvente foi adicionada à água do aquário. De acordo com Xiong et al. (2017), o DMSO em concentrações de até 1,0% vol/vol não causa efeitos comportamentais em *Gobiocypris rarus* e *Danio rerio* em sete dias de exposição. Deve-se observar que as concentrações de fármaco se referem à quantidade de substância na água e não à quantidade biodisponível para o peixe.

A exposição ao diazepam foi estática, com adição do fármaco ao início do experimento e sem renovação ou troca de água e de fármaco. As dissoluções foram feitas imediatamente antes de serem aplicadas nos aquários, a fim de minimizar a fotodegradação do fármaco. Conforme Calisto et al. (2011), a meia-vida do diazepam na água sob iluminação intensa e temperatura de 40°C é de sete dias.

### **2.4. Avaliação de parâmetros comportamentais**

Os testes comportamentais avaliaram alimentação, atividade locomotora, agressividade e ansiedade. Em todos os testes o comportamento dos peixes foi registrado por um sistema de câmeras (HD, Intelbras®) e os vídeos analisados posteriormente.

#### **2.4.1. Comportamento alimentar**

A latência para captura de alimento foi avaliada, uma vez que fármacos podem causar alteração na ingestão alimentar (Brodin et al., 2013). Para isso, cada aquário foi filmado por dois minutos, no período da manhã, após a introdução de ração no aquário (cinco *pellets*), conforme Volkoff (2013) (Figura 2). Consideramos como latência o tempo para captura do primeiro *pellet*. Para a realização do teste, todos os animais permaneceram em jejum por 16h.

Alterações nesse comportamento permitem mensurar efeitos sobre organismos que podem ter consequências em nível ecossistêmico, principalmente porque os peixes influenciam na estrutura das comunidades aquáticas (Johansson & Brodin, 2003).

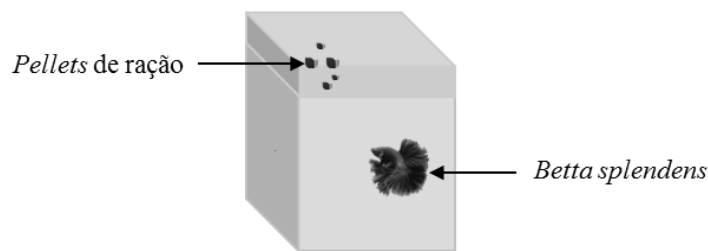


Figura 2. Esquema dos aquários para avaliar o comportamento alimentar.

#### 2.4.2. Atividade locomotora

Avaliamos a atividade locomotora dos peixes durante cinco minutos, antes da oferta de alimento, conforme Kohlert et al. (2012), uma vez que fármacos podem afetar esse parâmetro (Kohlert et al., 2012; Brodin et al., 2013). Segundo Dugatkin (1992), indivíduos com alto grau de atividade têm maior risco de predação.

A parede frontal de cada aquário foi dividida em 16 quadrantes com lados de cinco centímetros. No período registrado analisou-se o tempo que se deslocaram em segundos e o número de quadrantes atravessados (tendo o centro do olho como medida de referência) para estimar a distância percorrida (em centímetros) e a velocidade de locomoção (distância percorrida, em centímetro/tempo de locomoção, em segundos) (Figura 3).

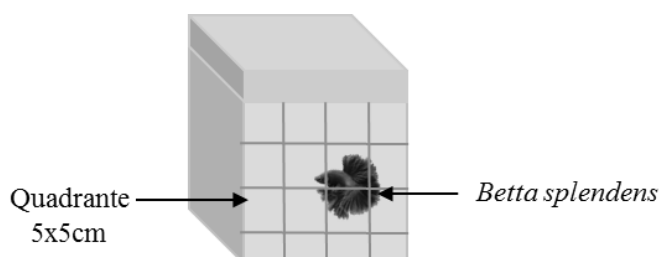


Figura 3. Esquema dos aquários com os quadrantes na parede frontal para avaliar atividade locomotora.

#### 2.4.3. Agressividade

O comportamento agressivo em peixes é importante para proteção de territórios, fêmeas e ninhos, permitindo a reprodução e sobrevivência da espécie (Todd et al., 2008). A expressão desse comportamento pode ser alterada por ansiolíticos (Lynn et al., 2007) e foi avaliada pelo teste do espelho, conforme Kohlert et al. (2012).

O teste do espelho é empregado para avaliar a agressividade nos animais, pois os peixes não reconhecem a própria imagem refletida no espelho, confundindo-a com um intruso (Rowland, 1999). Assim, muitos aspectos que podem interferir em uma luta, como diferenças

de peso, tamanho e experiência de luta, são neutralizados ao utilizar o teste do espelho (Abate, 2005; Rhoad et al., 1975).

Para análise desse comportamento, um espelho plano (20 cm x 15 cm), inicialmente protegido com uma folha azul, foi colocado na lateral esquerda de cada aquário cobrindo completamente a parede. Após cinco minutos, a folha protetora foi retirada, permitindo a visualização da imagem refletida no espelho, e o comportamento foi registrado por cinco minutos (Figura 4) e, então, quantificou-se a latência para ataque (em segundos) e a frequência de ataques ao espelho.

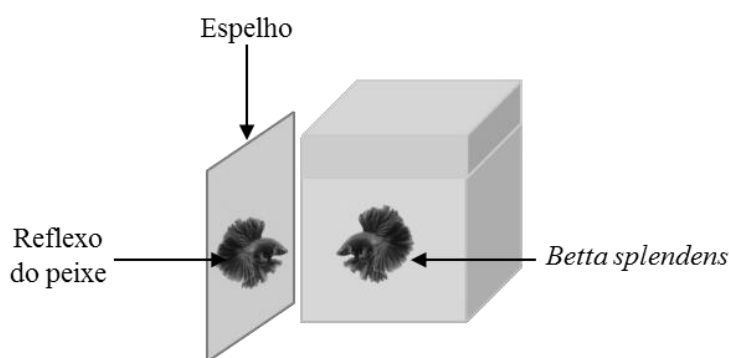


Figura 4. Esquema do teste do espelho para avaliar a agressividade.

#### 2.4.4. Ansiedade

Fármacos que atuam nas funções do sistema nervoso central podem provocar efeitos em comportamentos preditivos de ansiedade (Brandão et al., 2013), como preferência por regiões periféricas (tigmotaxia) (Giacomini et al., 2016) ou regiões escuras (escototaxia) (Steenbergen et al., 2011). Embora sejam comportamentos semelhantes à ansiedade, a tigmotaxia e a escototaxia são qualitativamente diferentes e, portanto, podem ser diferencialmente sensíveis a várias substâncias ansiolíticas (Hope et al. 2019).

Bencan et al. (2009), demonstraram que o ambiente novo induz ansiedade e os organismos aumentam ou reduzem o tempo próximo nas regiões periféricas (tigmotaxia) dependendo do tratamento. Para avaliar comportamento preditivo de ansiedade, realizamos o teste de campo aberto (Figura 5), conforme Prut & Belzung (2003). Cada peixe foi inserido em um tanque teste (compartimento circular plástico de 30 cm de diâmetro e uma coluna d'água de 7 cm) com uma filmadora instalada na parte superior, no período da manhã. Avaliou-se o tempo de permanência dos peixes na região periférica (4,4 cm de distância da parede da arena, equivalente à 50% da área total) e a frequência de entradas na região central (raio de 10,6 cm).

O peixe permaneceu por cinco minutos no tanque teste, período no qual seu comportamento foi filmado. A água do tanque foi trocada após cada teste.

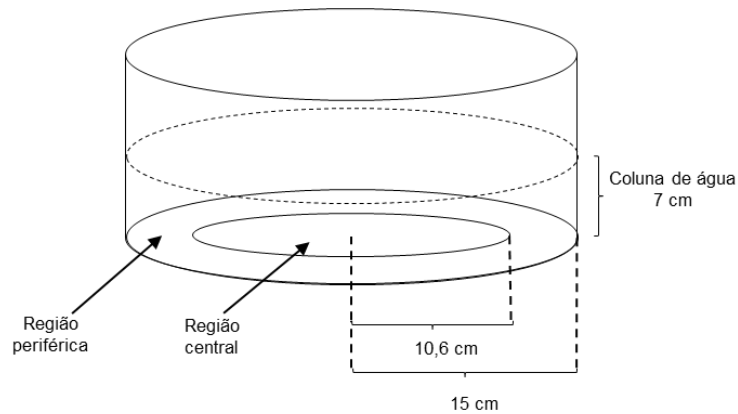


Figura 5. Esquema do tanque de teste de campo aberto para avaliar o comportamento de tigmotaxia.

Adicionalmente, avaliamos a preferência por regiões escuras (escototaxia), uma vez que o aumento da atividade no compartimento claro indica efeito ansiolítico (Maximino et al., 2010). A arena de vidro utilizada (15 cm de altura  $\times$  10 cm de largura  $\times$  45 cm de comprimento), apresentou 50% de revestimento preto e 50% de revestimento branco, conforme Maximino et al. (2010) e preenchido com coluna de água de 10 cm, produzindo um volume final de 4,5 L (Figura 6).

O teste foi realizado no período da tarde após cinco minutos de habituação no compartimento central. Assim que as portas centrais foram removidas, permitindo que o peixe nadasse livremente na arena, quantificou-se o tempo de permanência no compartimento escuro e a frequência de cruzamentos da linha média durante 15 minutos, filmados por uma câmera posicionada superiormente à arena, conforme Maximino et al. (2010). A água da arena foi trocada após cada teste.

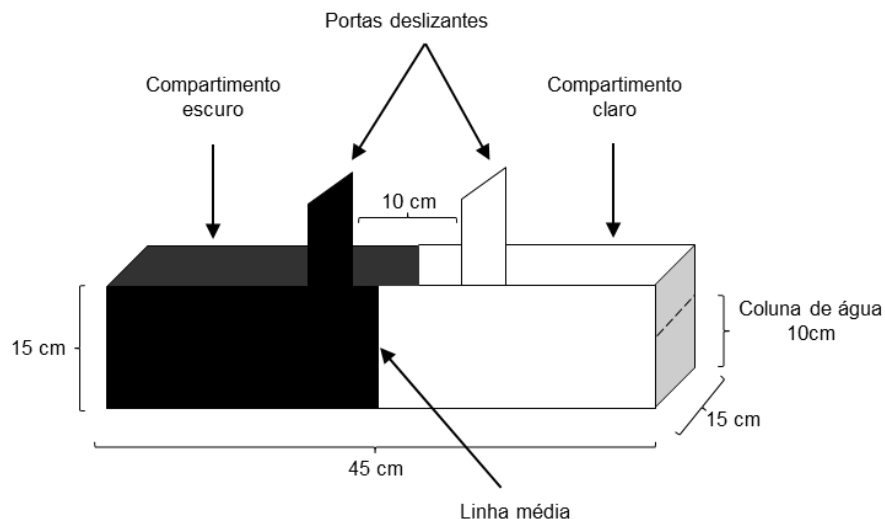


Figura 6. Esquema da arena teste de preferência claro/escuro para avaliar o comportamento de escototaxia.

## 2.5. Análise estatística

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

## 2.6. Questões éticas

A metodologia adotada no presente experimento foi consistente com os princípios para a experimentação animal e todos os esforços foram realizados para minimizar o número de animais utilizados, assim como o grau de sofrimento imposto aos animais. Além disso, o projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto Federal Goiano, sob o protocolo nº 8029030717.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1. Comportamento alimentar

O resultado da análise dos dados da latência para captura de alimento encontra-se na Figura 7. Não houve diferença significativa entre os grupos em cada dia de exposição [Kruskal-Wallis, 0h:  $H_{2,48}=4,08$ ,  $p=0,13$ ; 24h:  $H_{2,48}=4,51$ ,  $p=0,1$ ; 72h:  $H_{2,48}=0,26$ ,  $p=0,88$ ; 120h:  $H_{2,48}=0,67$ ,  $p=0,71$ ] (Figura 7).



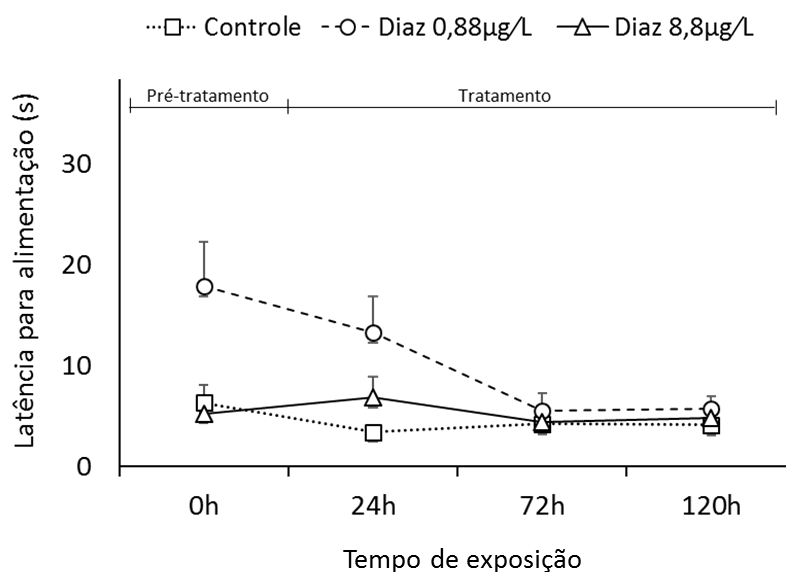


Figura 7. Latência (em segundos) para captura de alimento nos grupos Controle, Diaz 0,88 µg/L e Diaz 8,8 µg/L, a 0h (pré-tratamento), 24h, 72h e 120h de exposição. Barras de erro representam erro padrão (n = 16). Kruskal-Wallis (pós-teste Dunn) compara os grupos em cada período ( $P > 0,05$ ).

No presente estudo, as concentrações utilizadas de diazepam, durante cinco dias de exposição, não causaram alteração no comportamento alimentar de *Betta splendens*. Entretanto, estudos com concentrações maiores indicam que o diazepam pode estimular o comportamento alimentar. Brodin et al. (2013), por exemplo, ao expor *Perca fluviatilis* por sete dias em 1,8 µg/L e 910 µg/L de oxazepam, outro benzodiazepínico, verificaram redução da latência para a alimentação. Assim, concentrações maiores de benzodiazepínicos podem afetar o comportamento alimentar, por meio de receptores GABA (Snigirov & Sylantsev, 2018), indicando risco de alterações comportamentais em organismos expostos a altas concentrações desses medicamentos.

Os benzodiazepínicos são compostos que induzem a hiperfagia e ativam o apetite após a ligação aos receptores GABA em várias espécies de animais, incluindo peixes e humanos (Brown et al., 1976; Baile e McLaughlin, 1979; Cooper et al., 1985; Gaskins et al., 2008; Snigirov & Sylantsev, 2018; Haney et al., 1997). Ao alterar o comportamento alimentar, os poluentes podem produzir mudanças nas interações predador-presa, o que pode resultar em mudanças na população das espécies predadoras, nas espécies de presas ou em ambas. (Weis et al., 2001).

### 3.2. Atividade locomotora

O resultado da análise dos dados da atividade locomotora encontra-se na Figura 8. Não houve diferença no tempo de lomoção entre os grupos [ANOVA, 0h:  $F_{2,48}=0,02$ ,  $p=0,98$ ; 24h:  $F_{2,48}=1,32$ ,  $p=0,27$ ; 72h:  $F_{2,48}=1,03$ ,  $p=0,36$ ; 120h:  $F_{2,48}=0,06$ ,  $p=0,94$ ], conforme a Figura 8A.

Em relação à distância percorrida, houve aumento no grupo Diaz 8,8  $\mu\text{g/L}$  em 72h de exposição, conforme ilustra a Figura 8B [ANOVA, 0h:  $F_{2,48}=0,29$ ,  $p=0,75$ ; 24h:  $F_{2,48}=0,23$ ,  $p=0,79$ ; 72h: pós-teste LSD  $p<0,05$ ; 120h:  $F_{2,48}=0,47$ ,  $p=0,63$ ].

Sobre a velocidade média de natação, houve aumento da velocidade no grupo Diaz 8,8  $\mu\text{g/L}$  em 24h e 72h de exposição, conforme ilustra a Figura 8C [Kruskal-Wallis, 0h:  $H_{2,48}=2,78$ ,  $p=0,3$ ; 24h:  $H_{2,48}=9,95$ ,  $p<0,05$ , pós-teste Dunn  $p<0,05$ ; 72h:  $H_{2,48}=9,81$ ,  $p<0,05$ , pós-teste Dunn  $p<0,05$ ; 120h:  $H_{2,48}=1,89$ ,  $p=0,39$ ].

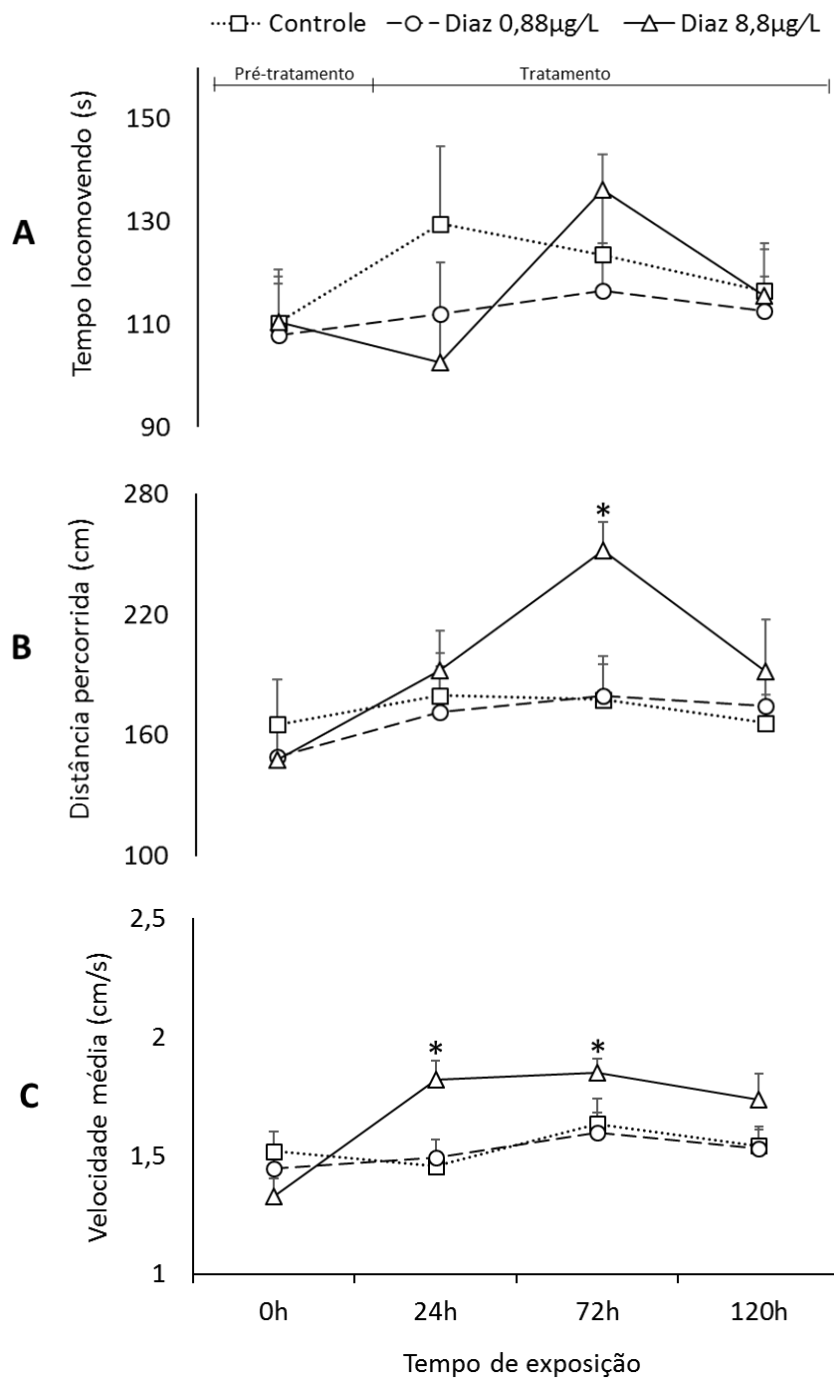


Figura 8. Atividade locomotora dos peixes nos grupos Controle, Diaz 0,88 µg/L e Diaz 8,8 µg/L, a 0h (pré-tratamento), 24h, 72h e 120h de exposição. (A) Tempo locomovendo (segundos) durante cinco minutos. (B) Distância percorrida (em centímetros) durante cinco minutos. (C) Velocidade média (cm/s) durante cinco minutos. Barras de erro representam erro padrão (n = 16). ANOVA (pós-teste LSD) e Kruskal-Wallis (pós-teste Dunn) comparam os grupos em cada período (\*  $P < 0,05$ ).

Nossos resultados indicam aumento da distância percorrida em 72h e da velocidade média em 24h e 72h de exposição, no grupo Diaz 8,8 µg/L, o que demonstra aumento de atividade dos animais. Outros estudos corroboram o efeito do diazepam no aumento da

atividade em peixes. Oggier et al. (2010) demonstraram esse efeito em embriões de *Danio rerio* após três dias de exposição a 273 µg/L de diazepam. Gebauer et al. (2011) observaram efeito semelhante em *Danio rerio* adultos expostos a 160 µg/L de diazepam após 10 minutos de tratamento. Brandão et al. (2013) submeteram *Lepomis gibbosus* juvenis a 266 µg/L de diazepam por 96 horas e também observaram aumento da atividade.

Os estudos disponíveis na literatura mostram aumento da atividade em peixes expostos a concentrações de diazepam, pelo menos, 180 vezes maior que a concentração ambiental. Porém, nosso estudo encontrou alterações nesse comportamento em 8,8 µg/L de diazepam, concentração ambientalmente relevante, que possivelmente pode ser alcançada no ambiente aquático devido a introdução contínua deste fármaco em ambientes aquáticos, segundo Calisto et al. (2011).

A atividade locomotora é um comportamento ecologicamente importante (Brodin et al. 2013) e está diretamente relacionada ao risco de predação (Dugatkin, 1992). Assim, o aumento da atividade locomotora, como observado em nosso estudo, causado por poluentes, pode ter efeitos ecológicos, conforme sugere Brodin et al. (2013).

### **3.3. Agressividade**

O resultado da análise dos dados do teste do espelho sobre a agressividade está disposto na Figura 9. Não houve efeito do tratamento na latência para atacar o espelho [Kruskal-Wallis, 0h:  $H_{2,48}=4,31$ ,  $p=0,11$ ; 24h:  $H_{2,48}=1,96$ ,  $p=0,37$ ; 72h:  $H_{2,48}=0,98$ ,  $p=0,61$ ; 120h:  $H_{2,48}=0,61$ ,  $p=0,73$ ] (Figura 9A).

Em relação à frequência de ataques, houve efeito do tratamento, com redução da frequência nos grupos Diaz 0,88 µg/L e Diaz 8,8 µg/L, com 24h de exposição do fármaco [Kruskal-Wallis, 0h:  $H_{2,48}=5,75$ ,  $p=0,05$ ; 24h: pós-teste de Dunn  $p<0,05$ ; 72h:  $H_{2,48}=3,82$ ,  $p=0,15$ ; 120h:  $H_{2,48}=4,48$ ,  $p=0,11$ ] (Figura 9B).

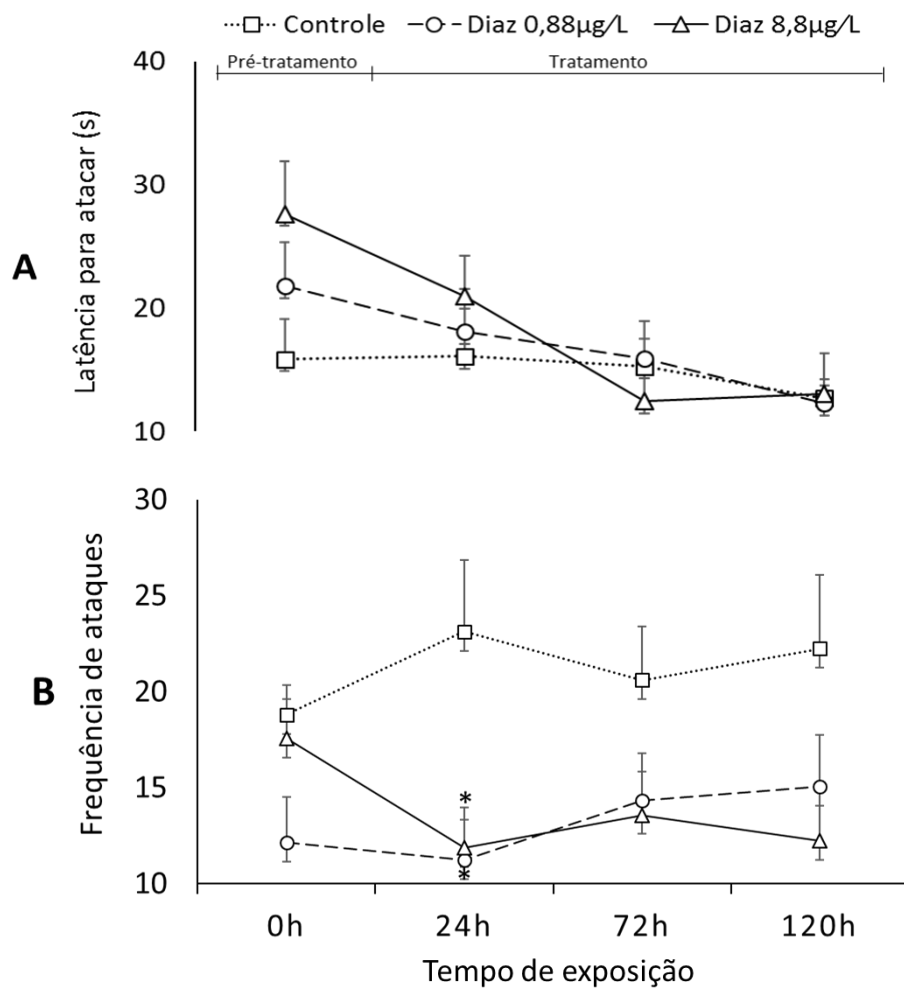


Figura 9. Comportamento agressivo dos peixes avaliado pelo teste do espelho durante cinco minutos nos grupos Controle, Diaz 0,88 µg/L e Diaz 8,8 µg/L, a 0h (pré-tratamento), 24h, 72h e 120h de exposição. (A) Latência para atacar (em segundos). (B) Frequência de ataques. Barras de erro representam erro padrão (n = 16). Kruskal-Wallis (pós-teste Dunn) compara os grupos em cada período (\* $P < 0,05$ )

Nosso estudo demonstrou que a exposição a curto prazo ao diazepam em concentração ambiental (0,88 µg/L) diminui a frequência de ataques em *Betta splendens*, indicando redução na agressividade. De acordo com Bencan et al. (2009), esse efeito não deve ser considerado sedativo, pois essa concentração não causou diminuição da atividade locomotora.

Giacomini et al. (2016) realizaram testes com *Danio rerio* (machos e fêmeas) expostos a 16 µg/L de diazepam por 15 minutos e não encontraram alteração no comportamento agressivo. Apesar desta concentração ser superior à concentração ambiental, o período de exposição foi inferior ao utilizado em nosso estudo e utilizou peixes de ambos os sexos, os quais podem apresentar diferentes respostas em testes de agressividade.

Diversos estudos demonstram que a expressão da agressividade em peixes depende de andrógenos, como testosterona e 11-cetotestosterona (Villars, 1983; Borg, 1994; Simon, 2002). Overturf et al. (2016) constataram redução na expressão de enzimas esteroideogênicas ligadas diretamente às concentrações plasmáticas de testosterona em *Ictalurus punctatus* juvenis expostos a 1 µg/L de diazepam por sete dias. Neste sentido, é possível que peixes machos adultos expostos ao diazepam apresentem redução significativa da produção de hormônios relacionados ao comportamento agressivo.

Segundo Kohlert et al. (2012), o comportamento agressivo está diretamente relacionado ao estabelecimento de hierarquias de dominância e territórios para o acesso aos recursos essenciais para a reprodução e sobrevivência de muitas espécies. Portanto, é possível que a redução da agressividade encontrada em nosso estudo possa afetar a viabilidade de peixes e outros organismos aquáticos.

### **3.4. Ansiedade**

O resultado da análise do teste de ambiente novo sobre o comportamento de tigmotaxia encontra-se na Figura 10. Em relação ao tempo na periferia [Kruskal-Wallis, 0h:  $H_{2,48}=2,76$ ,  $p=0,25$ ; 24h:  $H_{2,48}=2,05$ ,  $p=0,35$ ; 72h:  $H_{2,48}=1,44$ ,  $p=0,48$ ; 120h:  $H_{2,48}=1,74$ ,  $p=0,41$ ] (Figura 10A) e a frequência de entradas na região central [ANOVA, 0h:  $F_{2,48}=1,91$ ,  $p=0,15$ ; 24h:  $F_{2,48}=1,88$ ,  $p=0,16$ ; 72h:  $F_{2,48}=1,48$ ,  $p=0,23$ ; 120h:  $F_{2,48}=0,32$ ,  $p=0,72$ ] (Figura 10B) não houve diferença entre os grupos.

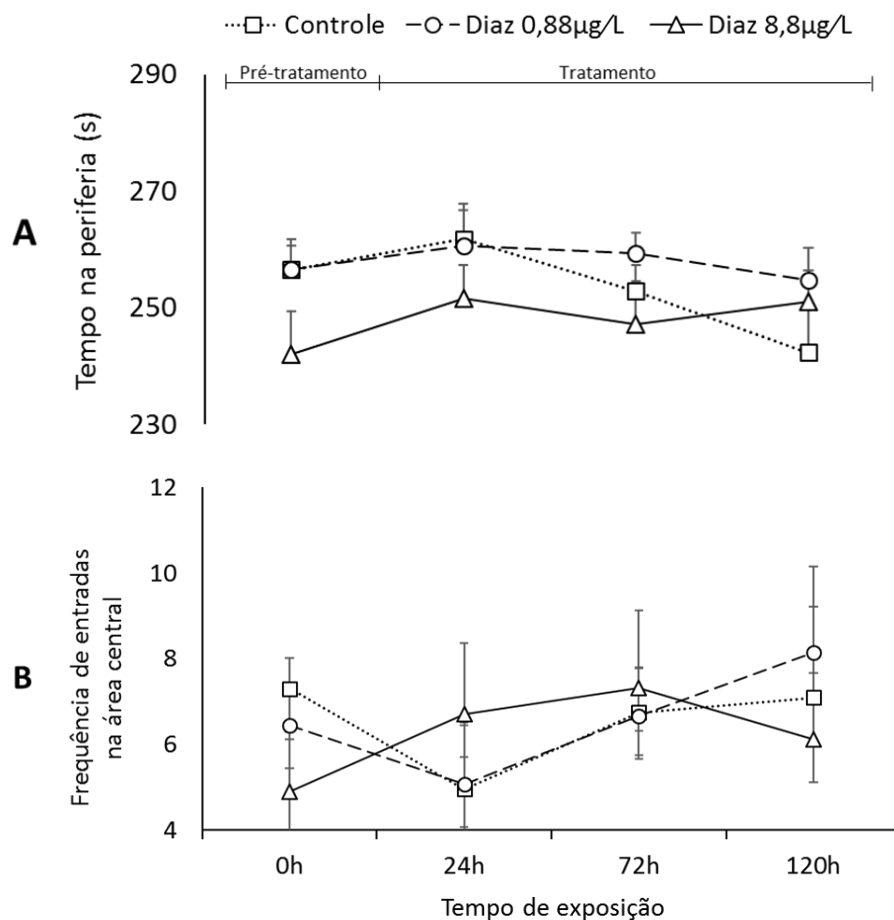


Figura 10. Tigmotaxia como comportamento preditivo de ansiedade no teste de campo aberto durante cinco minutos nos grupos Controle, Diaz 0,88 µg/L e Diaz 8,8 µg/L, a 0h (pré-tratamento), 24h, 72h e 120h de exposição. (A) Tempo na periferia (em segundos). (B) Frequência de entradas na área central. Barras de erro representam erro padrão (n = 16). ANOVA (pós-teste LSD) e Kruskal-Wallis (pós-teste Dunn) comparam os grupos em cada período ( $P > 0,05$ ).

O resultado da análise do teste de preferência por regiões escuras sobre o comportamento de escototaxia encontra-se na Figura 11. Em relação ao tempo no compartimento escuro, o tempo do grupo Diaz 0,88 µg/L foi o menor em 72h de exposição [Kruskal-Wallis, 0h:  $H_{2,48}=3,82$ ,  $p=0,14$ ; 24h:  $H_{2,48}=4,58$ ,  $p=0,1$ ; 72h:  $H_{2,48}=8,04$ ,  $p=0,01$  pós-teste Dunn  $p < 0,05$ ; 120h:  $H_{2,48}=2,34$ ,  $p=0,3$ ] (Figura 11A).

Na frequência de cruzamentos da linha média não houve efeito do tratamento entre os grupos [Kruskal-Wallis, 0h:  $H_{2,48}=1,17$ ,  $p=0,55$ ; 24h:  $H_{2,48}=0,04$ ,  $p=0,97$ ; 72h:  $H_{2,48}=0,60$ ,  $p=0,74$ ; 120h:  $H_{2,48}=0,38$ ,  $p=0,82$ ] (Figura 11B).

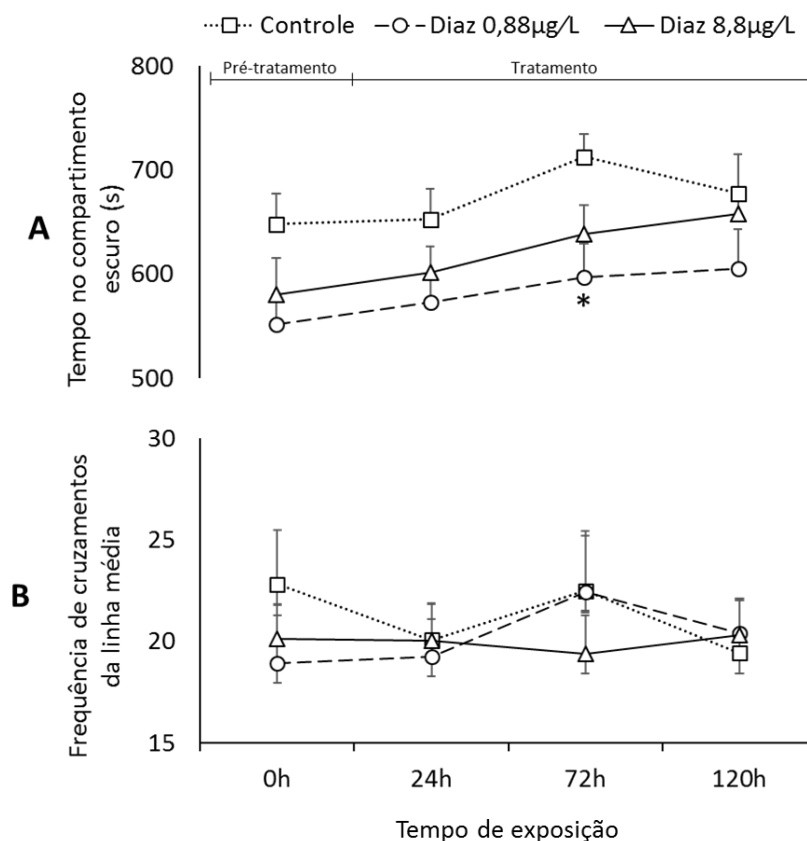


Figura 11. Escototaxia como comportamento preditivo de ansiedade no teste de preferência claro/escuro durante 15 minutos nos grupos Controle, Diaz 0,88 µg/L e Diaz 8,8 µg/L, a 0h (pré-tratamento), 24h, 72h e 120h de exposição. (A) Tempo no compartimento escuro (em segundos). (B) Frequência de cruzamentos da linha média. Barras de erro representam erro padrão (n = 16). Kruskal-Wallis (pós-teste Dunn) compara os grupos em cada período (\*P<0,05).

O comportamento de tigmotaxia em *Betta splendens* não foi alterado pelo diazepam em nosso estudo. Richendrfer et al. (2012), comprovaram que 0,05 mg/L de diazepam reduz o comportamento de tigmotaxia de larvas *Danio rerio* em exposição de 2h. Apesar de se tratar de uma concentração 56 vezes superior à ambiental, demonstra o efeito ansiolítico do diazepam em peixes.

Uma vez que o sistema GABAérgico desempenha papel importante na regulação da ansiedade (Weinberger, 2001; Gingrich, 2005), nosso estudo complementou a análise deste parâmetro avaliando o comportamento de escototaxia. Do mesmo modo que a periferia do tanque de teste de campo aberto representa uma área de refúgio para o animal, as regiões escuras são preferidas pela maioria das espécies para evitar um predador (Colwill & Creton, 2011; Champagne et al., 2010).



Nosso estudo encontrou efeito ansiolítico da concentração ambiental de diazepam após 72h de exposição pela análise do comportamento de escototaxia. A redução no tempo gasto no compartimento escuro pelo diazepam também foi observado por Brandão et al. (2013) após 72h de exposição em *Lepomis gibbosus*, porém utilizando 266 µg/L de diazepam, que é mais de 300 vezes a concentração ambiental. Steenbergen et al. (2011) encontraram esse efeito expondo por sete minutos *Danio rerio* juvenis em 750 µg/L de diazepam. Este período de exposição é muito inferior ao utilizado em nosso estudo, mas a concentração do fármaco é mais de 850 vezes a ambiental. Gebauer et al. (2011) também avaliaram a preferência claro/escuro de *Danio rerio* adultos e observaram um aumento no tempo de permanência no compartimento claro em 10 minutos de exposição, mas em 160 µg/L de diazepam, o que representa 180 vezes a concentração ambiental.

Além de corroborar com os outros estudos, evidenciando efeito ansiolítico do diazepam, nosso trabalho demonstra, pioneiramente, que a concentração ambiental do diazepam é suficiente para causar essa alteração. No ambiente natural, a redução da ansiedade pode provocar efeitos a nível de populações, pois aumentam o risco de predação dos organismos expostos ao ansiolítico (Brandão et al., 2013).

#### **4. CONCLUSÃO**

Nosso estudo mostrou que o diazepam em concentração ambiental reduz a agressividade e a ansiedade em *Betta splendens*, e a concentração 10 vezes a ambiental aumenta a atividade locomotora. Além disso, demonstrou que *Betta splendens* é um organismo adequado a estudos ecotoxicológicos que avaliam efeitos comportamentais e sensível a baixas concentrações de diazepam.

As alterações nos parâmetros comportamentais observadas nesse estudo, causados pela exposição ao diazepam em concentrações ambientalmente relevantes, devem ser motivos de preocupação, dada a remoção incompleta deste fármaco nas estações de tratamento de água e esgoto. Tais alterações são ecologicamente importantes, pois podem modificar as estruturas das comunidades aquáticas influenciando no crescimento e reprodução e também aumentando o risco de predação dos organismos não-alvos.

No entanto, reconhecemos que investigações com exposição prolongada e envolvendo avaliação de biodisponibilidade e mecanismos de ação são essenciais para melhor compreensão dos efeitos do diazepam e outros fármacos psicoativos nos ecossistemas aquáticos e os

potenciais riscos a outros organismos aquáticos e aos organismos que utilizam os recursos hídricos, incluindo as populações humanas.

## 5. REFERÊNCIAS

- ABATE, M.E. Using a popular pet fish species to study territorial behavior. **Journal of Biological Education**, v. 39, p. 81–86, 2005.
- ALYGIZAKIS, A.N. et al. Occurrence and spatial distribution of 158 pharmaceuticals, drugs of abuse and related metabolites in offshore seawater. **Science of Total Environment**, v. 514, p. 1097-1105, 2016.
- ANZELIUS, M. et al. Immunocytochemical localization of GABAA receptor beta 2/beta 3 subunits in the brain of Atlantic salmon (*Salmo salar* L). **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 8, p. 207–221, 1995.
- AYRES, M.; JUNIOR AYRES, M. BioEstat 2.0: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. **BioEstat 2.0: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas**, 2000.
- BACHHUBER, M.A. et al. Increasing benzodiazepine prescriptions and overdose mortality in the United States, 1996–2013. **American Journal of Public Health**, v. 106, n. 4, p. 686-688, 2016.
- BAILE, C.A.; MCLAUGHLIN, C.L. A review of the behavioral and physiological responses to elfazepam, a chemical feed intake stimulant. **Journal of Animal Science**, v. 49, p. 1371-1395, 1979.
- BALDESSARINI, R.J. Drugs and the treatment of psychiatric disorders; psychosis and anxiety. **The Pharmacological Basis of Therapeutics**, p. 399-430, 1996.
- BENCAN, Z. et al. Buspirone, chlordiazepoxide and diazepam effects in a zebrafish model of anxiety. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 94(1), p. 75-80, 2009.
- BENOTTI, M.J. et al. Pharmaceuticals and endocrine disrupting compounds in U.S. drinking water. **Environmental Science and Technology**, v. 43, p. 597-603, 2009.
- BETTI, L. et al. [3H] Ro 15-1788 binding sites to brain membrane of the saltwater Mugilcephalus. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 128(3), p. 291-297, 2001.
- BÖGER, B. et al. Determination of carbamazepine and diazepam by SPE-HPLC-DAD in Belém River water, Curitiba-PR/Brazil. **Revista Ambiente & Água**, v. 13(2), 2018.
- BOLIS, C.L. et al. Fish as model in pharmacological and biological research. **Pharmacological Research**, v. 44(4), p. 265-268, 2001.
- BORG, B. Androgens in teleost fishes. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology**, v. 109(3), p. 219-245, 1994.
- BRANDÃO, F.P. et al. Short-term effect of neuroactive pharmaceutical drugs on a fish species: biochemical and behavioural effects. **Aquatic Toxicology**, v. 144-145, p. 218-229, 2013.
- BRODIN, T. et al. Dilute concentrations of a psychiatric drug alter behavior of fish from natural populations. **Science**, v. 339, p. 814-815, 2013.

- BRODIN, T. et al. Ecological effects of pharmaceuticals in aquatic systems – impacts through behavioural alterations. **Philosophical Transactions of The Royal Society B: Biological Sciences**, v. 369, p. 1-10, 2014.
- BRODIN, T.; JOHANSSON, F. Conflicting selection pressures on the growth/predation-risk trade-off in a damselfly. **Ecology**, v. 85(11), p. 2927-2932, 2004.
- BRONSTEIN, P.M. Predictors of dominance in male *Betta splendens*. **Journal of Comparative Psychology**, v. 99, p. 47-55, 1985.
- BROWN, A.R. et al. Assessing variation in the potential susceptibility of fish to pharmaceuticals, considering evolutionary differences in their physiology and ecology. **Philosophical Transactions of The Royal Society B**, v. 369, p. 1-11, 2014.
- BROWN, R.F. et al. Stimulation of food intake in horses by diazepam and promazine. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 5, p. 495-497, 1976.
- CALISTO, V. et al. Photodegradation of psychiatric pharmaceuticals in aquatic environments– Kinetics and photodegradation products. **Water Research**, v. 45(18), p. 6097-6106, 2011.
- CALISTO, V.; ESTEVES, V.I. Psychiatric pharmaceuticals in the environment - a review. **Chemosphere**, v. 77(10), p. 1257-1274, 2009.
- CARDOSO, O. et al. Factory-discharged pharmaceuticals could be a relevant source of aquatic environment contamination: review of evidence and need for knowledge. **Chemosphere**, v. 115, p. 20-30, 2014.
- CARLSSON, C. et al. Are pharmaceuticals potent environmental pollutants? Part I: environmental risk assessment of selected active pharmaceutical ingredients. **Science and Total Environment**, v. 364, p. 67-87, 2006.
- CARR, R.L. et al. The interaction of chlorinated alicyclic insecticides with brain GABA(A) receptors in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Journal of Toxicology and Environmental Health Part A**, v. 56, p. 543–553, 1999.
- CASTRO, A.L.S. et al. Visual communication stimulates reproduction in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L). **Brasilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 42, p. 368-374, 2009.
- CHAMPAGNE, D.L. et al. Translating rodent behavioral repertoire to zebrafish (*Danio rerio*): relevance for stress research. **Behavioural Brain Research**, v. 214(2), p. 332-342, 2010.
- CLOTFELTER, E.D. et al. Serotonin decreases aggression via 5-HT1A receptors in the fighting fish *Betta splendens*. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 87, p. 222–231, 2007.
- CLOTFELTER, E.D. et al. The role of animal behavior in the study of endocrine-disrupting chemicals. **Animal Behavior**, v. 68, p. 665–676, 2004.
- CLOTFELTER, E.D.; RODRIGUEZ, A.C. Behavioral changes in fish exposed to phytoestrogens. **Environmental Pollution**, v. 144(3), p. 833-839, 2006.
- COLWILL, R.M.; CRETON, R. Locomotor behaviors in zebrafish (*Danio rerio*) larvae. **Behavioural Processes**, v. 86(2), p. 222-229, 2011.
- CONTI, E. et al. Orientation behavior is a good biomarker of trace metal contamination in *Parallelomorpha laevigatus* (Coleoptera, Carabidae). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, p. 17642–17650, 2017.

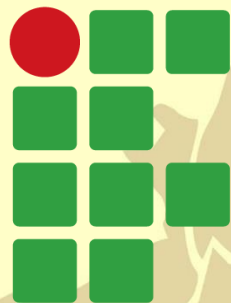
- COOPER, S.J. et al. Benzodiazepine receptor ligands and the consumption of a highly palatable diet in non-deprived male rats. **Psychopharmacology**, v. 86, p. 348-355, 1985.
- DE ABREU, M.S. et al. Diazepam and fluoxetine decrease the stress response in zebrafish. **Plos One**, v. 9(7), p. 1-5, 2014.
- DESBROW, C. et al. Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 1. Chemical fractionation and in vitro biological screening. **Environmental Science and Technology**, v. 32, p. 1549-1558, 1998.
- DUGATKIN, L.A. Tendency to inspect predators predicts mortality risk in the guppy (*Poecilia reticulata*). **Behavioral Ecology**, v. 3(2), p. 124-127, 1992.
- FENT, K. et al. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. **Aquatic Toxicology**, v. 76, p. 122-59, 2006.
- FERRARI, B. et al. Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters: study of carbamazepine, clofibric acid, and diclofenac. **Ecotoxicology and Environment Safety**, v. 55, p. 359-370, 2003.
- GASKINS, L.A. et al. Effect of oral diazepam on feeding behavior and activity of Hawai'i amakihi (*Hemignathus virens*). **Applied Animal Behaviour Science**, v. 112, p. 384-394, 2008.
- GEBAUER, D.L. et al. Effects of anxiolytics in zebrafish: similarities and differences between benzodiazepines, buspirone and ethanol. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 99, p. 480-486, 2011.
- GIACOMINI, A.C.V.V. et al. Fluoxetine and diazepam acutely modulate stress induced-behavior. **Behavioural Brain Research**, v. 296, p. 301-310, 2016.
- GINGRICH, J.A. Oxidative stress is the new stress. **Nature Medicine**, v. 11, p. 1281-1282, 2005.
- GROS, M. et al. Removal of pharmaceuticals during wastewater treatment and environmental risk assessment using hazard indexes. **Environment International**, v. 36(1), p. 15-26, 2010.
- GUNNARSSON, L. et al. Evolutionary conservation of human drug targets in organisms used for environmental risk assessments. **Environmental Science & Technology**, v. 42(15), p. 5807-5813, 2008.
- HALLING-SØRENSEN, B. et al. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment – a review. **Chemosphere**, v. 36, p. 357-393, 1998.
- HANEY, M. et al. Alprazolam increases food intake in humans. **Psychopharmacology**, v. 132, p. 311-314, 1997.
- HELLOU, J. Behavioural ecotoxicology, an “early warning” signal to assess environmental quality. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 18, p. 1-11, 2011.
- HOGAN, J.A. Fighting and reinforcement in the Siamese fighting fish (*Betta splendens*). **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 64, p. 356-359, 1967.
- HOPE, B. V. et al. Submerged plus maze: A novel test for studying anxiety-like behaviour in fish. **Behavioural Brain Research**, v. 362, p. 332-337, 2019.
- JELIC, A. et al. Occurrence, partition and removal of pharmaceuticals in sewage water and sludge during wastewater treatment. **Water Research**, v. 45(3), p. 1165-1176, 2011.

- JOHANSSON, F.; BRODIN, T. Effects of fish predators and abiotic factors on dragonfly community structure. **Journal of Freshwater Ecology**, v. 18(3), p. 415-423, 2003.
- JONES, O.A.H. et al. Aquatic environmental assessment of the top 25 English prescription pharmaceuticals. **Water Research**, v. 36, p. 5013-5022, 2002.
- KOHLERT, J.G. et al. Decreased aggressive and locomotor behaviors in *Betta splendens* after exposure to fluoxetine. **Psychological Reports**, v. 110(1), p. 51-62, 2012.
- KOLPIN, D.W. et al. Pharmaceuticals, hormones, and others organic wastewater contaminants in US streams, 1999-2000: a national reconnaissance. **Environmental Science and Technology**, v. 36, p. 1202-1211, 2002.
- LEYS, C. et al. Detecting outliers: Do not use standard deviation around the mean, use absolute deviation around the median. **Journal of Experimental Social Psychology**, v. 49(4), p. 764-766, 2013.
- LYNN, S.E. et al. Fish on Prozac: a simple, noninvasive physiology laboratory investigating the mechanisms of aggressive behavior in *Betta splendens*. **Advances in Physiology Education**, v. 31, n. 4, p. 358-363, 2007.
- MAXIMINO, C. et al. Scototaxis as anxiety-like behavior in fish. **Nature Protocols**, v. 5(2), p. 209, 2010.
- MCROBB, F.M. et al. In silico analysis of the conservation of human toxicity and endocrine disruption targets in aquatic species. **Environmental Science and Technology**, v. 48, p. 1964-1972, 2014.
- OGGIER D.M. et al. Effects of diazepam on gene expression and link to physiological effects in different life stages in zebrafish *Danio rerio*. **Environmental Science and Technology**, v. 44, p. 7685-7691, 2010.
- OVERTURF, C.L. et al. Bioconcentration and endocrine disruption effects of diazepam in channel catfish, *Ictalurus punctatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 183, p. 46-52, 2016.
- 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**, v. 463(1-3), p. 3-33, 2003.
- PURDOM, C.E. et al. Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. **Chemical Ecology**, v. 8, p. 275-285, 1994.
- RHOAD, K.E. et al. Aggression and avoidance by *Betta splendens* toward natural and artificial stimuli. **Animal Learning & Behavior**, v. 3, p. 271-276, 1975.
- RICHENDRFER, H. et al. On the edge: pharmacological evidence for anxiety-related behavior in zebrafish larvae. **Behavioural Brain Research**, v. 228, p. 99-106, 2012.
- ROUTLEDGE, E.J. et al. Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 2. In vivo responses in trout and roach. **Environmental Science and Technology**, v. 32, p. 1559-1565, 1998.
- ROWLAND, W.J. Studying visual cues in fish behavior: a review of ethological techniques. **Environmental Biology of Fishes**, v. 56, p. 285-305, 1999.
- SANTOS, L.H. et al. Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. **Journal of Hazardous Materials**, v. 175(1-3), p. 45-95, 2010.

- SCOTT, G.R.; SLOMAN, K.A. The effects of environmental pollutants on complex fish behavior: integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. **Aquatic Toxicology**, v. 68, p. 369-392, 2004.
- SHADER, R.I.; GREENBLATT, D.J. Clinical implications of benzodiazepine pharmacokinetics. **The American Journal of Psychiatry**, v. 134(6), p. 652–656, 1977.
- SIMON, N.G. Hormonal processes in the development and expression of aggressive behavior. **Hormones, Brain and Behavior**, Academic Press, p. 339-I, 2002.
- SNIGIROV, S.; SYLANTYEV, S. GABAA receptors activate fish feeding behaviour via two distinct functional pathways. **Journal of Experimental Biology**, v. 221(3), p. jeb170514, 2018.
- SNYDER, S.A. Occurrence, treatment and toxicological relevance of EDCs and pharmaceuticals in water. **Ozone Science and Engineering**, v. 30, p. 65-69, 2008.
- STEENBERGEN, P.J. et al. Patterns of avoidance behaviours in the light/dark preference test in young juvenile zebrafish: a pharmacological study. **Behavioural Brain Research**, v. 222(1), p. 15-25, 2011.
- SUBEDI, B.; KANNAN, K. Occurrence and fate of select psychoactive pharmaceuticals and antihypertensives in two waste treatment plants in New York State, USA. **Science of Total Environment**, v. 514, p. 273-280, 2015.
- TERNES, T. et al. Determination of neutral pharmaceuticals in wastewater and rivers by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography**, v. 938, p. 175-185, 2001.
- TERNES, T.A. Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. **Water Research**, v. 32, p. 3245-3260, 1998.
- TODD, N.E. et al. aggression, interactions, and preference for males in female siamese fighting fish (*Betta splendens*). **Journal of Behavioral and Neuroscience Research**, v. 6, p. 15-28, 2008.
- VAN DER VEN, K. et al. Neuropharmaceuticals in the environment: mianserin-induced neuroendocrine disruption in zebrafish (*Danio rerio*) using cDNA microarrays. **Environmental Toxicology Chemistry**, v. 25, p. 2645-2652, 2006.
- VAN DER VEN, K. et al. Determination of diazepam in aquatic samples by capillary liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. **Chemosphere**, v. 57(8), p. 967-973, 2004.
- VILLARS, T.A. Hormones and aggressive behavior in teleost fishes. **Hormones and Aggressive Behavior**, Springer, Boston, MA, p. 407-433, 1983.
- VOLKOFF, H. The effects of amphetamine injections on feeding behavior and the brain expression of orexin, CART, tyrosine hydroxylase (TH) and thyrotropin releasing hormone (TRH) in goldfish (*Carassius auratus*). **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 39(4), p. 979-991, 2013.
- WEINBERGER, D.R. Anxiety at the frontier of molecular medicine. **New England Journal of Medicine**, v. 344, p. 1247–1249, 2001.
- WEIS, J.S. et al. Effects of contaminants on behavior: biochemical mechanisms and ecological consequences. **BioScience**, v. 51, p. 209-217, 2001.
- WU, M. et al. Occurrence and fate of psychiatric pharmaceuticals in the urban water system of Shanghai, China. **Chemosphere**, v. 138, p. 486-493, 2015.

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

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



**INSTITUTO  
FEDERAL**

Goiano

---

Campus  
Urutaí

