



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

THAIS GRACIANO SANTOS SILVA

**EFEITOS DOS CONTAMINANTES EMERGENTES CAFEÍNA
E TRICLOSAN EM TELEÓSTEO NEOTROPICAL**

THAIS GRACIANO SANTOS SILVA

**EFEITOS DOS CONTAMINANTES EMERGENTES CAFEÍNA
E TRICLOSAN EM TELEÓSTEO NEOTROPICAL**

Tese apresentada ao curso de Doutorado em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para obtenção do título de doutora em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Cláudia B. R. Martinez

Londrina
2017

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DEFESA DE TESE DE DOUTORADO

Discente: **Thais Graciano Santos Silva**

Título: "***Prochilodus lineatus* exposto a contaminantes emergentes: o uso de biomarcadores bioquímicos, genéticos, fisiológicos e comportamentais para a determinação dos seus efeitos**".

Data da Defesa: 26 de maio de 2017 – 13:30hs, na sala Pós-Graduação do CIF da Universidade Estadual de Londrina.

Banca Examinadora

Parecer

PRESIDENTE:

Dra. Claudia Bueno dos Reis Martinez UEL

Aprovada

TITULARES

Dra. Juliana Delatim Simonato Rocha UEL

APROVADA

Dra. Dayana Moscardi dos Santos UEL

APROVADA

Dra. Marta Marques de Souza FURG

Aprovada

Dra. Helena Cristina da Silva de Assis UFPR

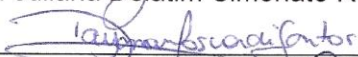
Aprovada

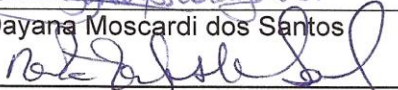
Parecer Final

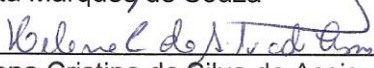
APROVADA


Dra. Claudia Bueno dos Reis Martinez


Dra. Juliana Delatim Simonato Rocha


Dra. Dayana Moscardi dos Santos


Dra. Marta Marques de Souza


Dra. Helena Cristina da Silva de Assis

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

Santos-Silva, Thais Graciano.

Efeitos dos contaminantes emergentes cafeína e triclosan em teleósteo Neotropical / Thais Graciano Santos-Silva. - Londrina, 2017.
123 f. : il.

Orientador: Cláudia Bueno dos Reis Martinez.

Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, 2017.
Inclui bibliografia.

1. biomarcadores - Tese. 2. comportamento - Tese. 3. osmorregulação - Tese. 4. *Prochilodus lineatus* - Tese. I. Martinez, Cláudia Bueno dos Reis. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. III. Título.

Dedico...

ao meu avô Mário (*in memoriam*), por sempre alimentar minha curiosidade, mesmo que isso significasse ficar horas em seu “quartinho” de carpinteiro me distraíndo com suas ferramentas. Obrigada vovô pela paciência e por me ensinar a sempre buscar algo novo para aprender.

AGRADECIMENTOS

Neste momento de finalização de um ciclo, fica impossível não lembrar com carinho e gratidão de todos que contribuíram para a conclusão deste trabalho, por isso deixo meus agradecimentos...

Primeiramente a Deus, por me dar o dom da sabedoria e paciência, para que eu conseguisse alcançar todos os meus objetivos e sonhos até aqui. Obrigada Senhor, por me guiar e se fazer presente na minha vida.

À prof^a Dr^a Cláudia Martinez, pela sua orientação, dedicação, carinho e amizade. Obrigada por mais uma vez abrir as portas do seu laboratório e permitir que eu fizesse parte desta equipe e família tão maravilhosa que é o LEFA. Mais uma vez, sua sabedoria e índole foram exemplos para minha vida profissional e pessoal.

Ao Alberto, diretor do Colégio Estadual Roseli Piotto Roehrig, e toda sua equipe pedagógica, pela compreensão em todas as vezes que não pude me dedicar totalmente ao colégio e por sempre estarem dispostos a adaptar meus horários de acordo com as minhas necessidades.

Aos meus pais, Silvio e Vera, minha avó Nena, minhas irmãs Daiany e Fernanda e meu sobrinho Víctor, por me apoiarem em todas as minhas escolhas, entenderem a minha ausência em momentos importantes e consolarem meus momentos de desânimo. Vocês são minha base.

Ao meu marido Thiago, por não hesitar em largar seu emprego e mudar para Londrina em busca do meu sonho. Obrigada por todas as vezes que não se aproveitou do seu momento de descanso, pois precisou ficar comigo nos finais de semana e feriados fazendo ensaios no laboratório. Obrigada por me consolar a cada vez que um experimento não dava certo. Obrigada pela paciência a cada vez que descontava minha frustração em você. Obrigada por me acalmar a cada vez que eu pensei em desistir. Esse trabalho não existiria se não fosse por você. Obrigada por me amar tanto!

Aos colegas do laboratório, eu não tenho nem como agradecer. Só quem passou pelo LEFA sabe o significado da palavra companheirismo. Esse companheirismo que acompanhou desde os experimentos até os momentos de descontração. Agradeço pelas ajudas em amostragens, por quem renovou água e cuidou das células nos dias em que eu estava na escola, pelos cometas feitos enquanto estava fazendo os parâmetros hematológicos, pelas ATPases e anidrases em dupla, pelos ensaios que varavam a noite, pelas comidas gostosas, pelas festas, pelas conversas, pelas risadas. Por isso, Andrea (Deia), Angélica (Xê), Angélica (Anchélica), Bruna, Cássia (Cassilds), Carlos, Carol (Carolaines), Débora, Éryka, Hellen, Laís, Laura (Lui), Luciana (Lu), Millena (Milleide), Nadjha, Natara, Rita, Thiego e Wagner, seria muito egoísmo dizer que este trabalho é só meu, pois em cada letra digitada nesta tese, existe a participação de cada um de vocês. Obrigada Lefianos!

Ao prof. Dr. Paulo Meletti, seus alunos André, Carlos e Sandy e também à técnica do departamento de fisiologia Fujiko, pela ajuda durante os ensaios comportamentais e por me introduzirem nessa área tão interessante e divertida.

À prof. Dr^a. Juliana Simonato, por mais uma vez aceitar compor a banca avaliativa, mas, principalmente, obrigada pela sua atenção e ensinamentos quando as dúvidas surgiam ao longo desses quatro anos e por suas palavras de carinho e amizade quando o desespero aparecia. Você é uma inspiração para mim como profissional, mãe e mulher.

À banca examinadora composta pela Dr^a. Dayana Moscardi dos Santos, Prof. Dr^a. Helena Cristina da Silva de Assis e Prof. Dr^a. Marta Marques de Souza, por aceitarem o convite e se disponibilizarem a contribuir com a conclusão deste trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina e seus docentes, pela oportunidade em aprimorar meus conhecimentos acadêmicos.

À estação de piscicultura da Universidade Estadual de Londrina e pisciculturas Aqua Norte (Cambará-PR), pelo fornecimento de peixes.

“Sem a curiosidade que me move, que me inquieta,
que me insere na busca, não aprendo nem ensino.”

(Paulo Freire)

SANTOS-SILVA, Thais Graciano. **Efeitos dos contaminantes emergentes cafeína e triclosan em teleósteo Neotropical**. 2017. 123 f. Tese de Doutorado. (Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

RESUMO

Contaminantes emergentes são compostos frequentemente encontrados em baixas concentrações nos ecossistemas aquáticos e que podem ocasionar danos à biota local, mas que ainda não possuem leis que regularizem seu descarte nesses ambientes. Produtos farmacêuticos e de higiene pessoal merecem destaque nesta categoria de contaminantes, uma vez que são substâncias de uso diário relacionadas à saúde e bem-estar da espécie humana. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos de dois contaminantes emergentes, cafeína e triclosan, para o peixe Neotropical *Prochilodus lineatus*, por meio de biomarcadores bioquímicos, genéticos, fisiológicos, hematológicos e comportamentais, após 24 e 168 h de exposição. Para isso, peixes jovens foram colocados em aquários contendo água limpa (CTR), concentrações de cafeína de 0,3; 3 e 30 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (CAF 0,3; CAF 3 e CAF 30), concentrações de triclosan de 0,1; 1 e 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (TCS 0,1; TCS 1 e TCS 10) ou metanol (solvente do triclosan). Dos resultados obtidos pode-se destacar que a cafeína aumentou a atividade de enzimas de biotransformação no fígado e diminuiu no cérebro após 168 h, porém isto não se refletiu num estado de estresse oxidativo. A cafeína também promoveu alterações nas concentrações plasmáticas de alguns íons e redução na atividade branquial de enzimas de transporte iônico, tanto em 24 h quanto em 168 h. O comportamento na natação de *P. lineatus* também foi afetado pela cafeína, porém esta interferência parece não estar relacionada com a atividade da acetilcolinesterase muscular. Por sua vez, o triclosan foi mais tóxico para *P. lineatus* ocasionando a morte de alguns indivíduos e promovendo danos oxidativos no fígado dos peixes expostos à maior concentração (TCS10) durante 168 h. Em conjunto, esses resultados mostram que a exposição ao triclosan causa danos mais severos no fígado enquanto a cafeína atua mais nas brânquias e no sistema nervoso, influenciando o comportamento de *P. lineatus*. Além disso, cabe ressaltar que tanto a cafeína como o triclosan precisam ser incluídos na legislação ambiental, uma vez que a presença destes contaminantes em corpos de água promovem alterações significativas na homeostase de uma espécie de peixe Neotropical.

Palavras-chave: Biomarcadores. Biotransformação. Estresse oxidativo. Comportamento. Osmorregulação. *Prochilodus lineatus*.

SANTOS-SILVA, Thais Graciano. **Effects of emerging contaminants caffeine and triclosan in Neotropical teleost**. 2017. 123 p. PhD Thesis. (Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

ABSTRACT

Emerging contaminants are compounds frequently found at very low concentrations in aquatic ecosystems that may cause damage to aquatic biota, but there are still no regulation concerning their disposal in these ecosystems in environmental legislation. Pharmaceuticals and personal care products have been considered emerging contaminants of great concern, as they are substances of daily use related to the health and well-being of the human species. Therefore, the objective of this work was to evaluate the effects of two emerging species, caffeine and triclosan, on the Neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus*, by using biochemical, genotoxic, physiological, hematological and behavioral biomarkers, after 24 and 168 h of exposure. Juvenile fish were placed in aquaria containing clean water (CTR), caffeine at concentrations of 0.3; 3 and 30 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (CAF 0.3, CAF 3 and CAF 30), triclosan at concentrations of 0.1; 1 and 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (TCS 0.1, TCS 1 and TCS 10) or methanol (triclosan solvent). Among the more important results we can point out that caffeine exposure increased the activity of biotransformation enzymes in the liver but reduced the activity of these enzymes in the brain, nevertheless caffeine did not lead to a state of oxidative stress. Caffeine also promoted alterations in plasmatic concentrations of some ions and reduced gill activity of ionic transport enzymes, after both exposure periods. The swimming behavior of *P. lineatus* was affected by caffeine, however this effect does not seem to be related with muscle acetylcholinesterase activity. On the other hand, triclosan was more toxic to *P. lineatus*, causing the death of some individuals and promoting oxidative damage in the liver of fish exposed to the highest concentration (TCS10) for 168 h. Taken together, these results show that exposure to triclosan causes more severe damage to the liver while caffeine acts more on the gills and nervous system, influencing the behavior of *P. lineatus*. In addition, it should be emphasized that both caffeine and triclosan need to be included in environmental legislation, since the presence of these contaminants in water bodies promotes significant changes in the homeostasis of a Neotropical fish species

Key-words: Biomarkers. Biotransformation. Oxidative stress. Behavior. Osmoregulation. *Prochilodus lineatus*.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	13
1 INTRODUÇÃO GERAL	13
1.1 Poluentes Emergentes e a Contaminação Aquática	13
1.2 Cafeína.....	16
1.3 Triclosan.....	17
1.4 Monitoramento de Ecossistemas Aquáticos Contaminados.....	19
1.4.1 O uso de biomarcadores	19
1.4.2 <i>Prochilodus lineatus</i> como espécie sentinela.....	24
2 JUSTIFICATIVA	25
3 HIPÓTESES	26
4 OBJETIVOS	26
4.1 Objetivo Geral	26
4.2 Objetivos Específicos	27
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27
CAPÍTULO II 38 Efeitos da cafeína para o teleósteo <i>Prochilodus lineatus</i> por meio de biomarcadores bioquímicos e genotóxicos	38
1 Introdução	40
2 Material e métodos	42
3 Resultados	45
4 Discussão	49
Referências Bibliográficas	53

CAPÍTULO III 58	interferência da cafeína no transporte iônico em brânquias de <i>Prochilodus lineatus</i>	58
1	Introdução	60
2	Material e métodos	62
3	Resultados	64
4	Discussão	67
	Referências Bibliográficas	69
CAPÍTULO IV 73	Alterações comportamentais em <i>Prochilodus lineatus</i> após exposição à cafeína	73
1	Introdução	75
2	Material e métodos	77
3	Resultados	80
4	Discussão	85
	Referências Bibliográficas	89
CAPÍTULO V 93	Efeitos do triclosan sobre as respostas de biomarcadores do peixe <i>Prochilodus lineatus</i>	93
1	Introdução	95
2	Material e Métodos	97
3	Resultados	103

4	Discussão	109
	Referências Bibliográficas	113
	CAPÍTULO IV - CONCLUSÕES GERAIS.....	121

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Poluentes Emergentes e a Contaminação Aquática

O desenvolvimento de tecnologias que visam facilitar a vida moderna acarretou em uma maior produção de substâncias químicas que, deliberadamente, são lançadas no ambiente gerando uma potencial ameaça para os seres vivos. Concomitantemente, o aumento na demanda por recursos hídricos para a produção e descarte destes compostos de origem antrópica despertou uma maior preocupação com a qualidade dos ecossistemas aquáticos (Bolong et al., 2009; Wilkinson et al., 2016). Até o início da década de 1990, a poluição aquática estava associada a compostos apolares como poluentes orgânicos persistentes (POP) e metais. Com isso, tais contaminantes foram sofrendo redução em sua emissão para os ecossistemas, visto que suas fontes poluidoras começaram a adotar medidas adequadas para o descarte de tais substâncias. Entretanto, outros compostos que não apresentavam relevância para a problemática da contaminação aquática começaram a ser investigados com maior cautela, passando a ser conhecidos como contaminantes emergentes (Petrovic et al., 2003).

É considerado um contaminante emergente qualquer substância que ainda não está regulamentada por leis ambientais, mas que, frequentemente, é detectada em ecossistemas aquáticos. Por serem encontrados em concentrações próximas de ng.L^{-1} e $\mu\text{g.L}^{-1}$, os contaminantes emergentes também são denominados micropoluentes (Luo et al., 2014; Campanha et al., 2015). Esta classe de contaminantes inclui produtos farmacêuticos e de higiene pessoal, drogas ilícitas, nanomateriais, genes de resistência a antibióticos, hormônios, surfactantes, aditivos industriais e retardantes de chama. Apesar dos baixos níveis de concentrações encontrados nos ambientes, sabe-se que estes contaminantes são capazes de ocasionar efeitos adversos na saúde humana e dos ecossistemas (Noguera-Oviedo e Aga, 2016)

Os produtos farmacêuticos e de higiene pessoal (PFHP) merecem destaque nesta categoria por serem substâncias relacionadas à saúde e bem-estar da espécie humana e espécies de criação, resultando em um alto consumo diário. Além disso, sua entrada no ambiente aquático ocorre de maneira simples: através da excreção

Capítulo I

após seu consumo ou do descarte direto do produto não utilizado (Figura 1) (Stuart et al., 2012; Yang et al., 2014; Wilkinson et al., 2015). Contudo, sabe-se que tais compostos não são eficientemente removidos através de processos de tratamento de água convencionais, o que remete a uma atenção maior sobre a presença destes produtos em fontes hídricas abastecidas por efluentes de águas residuais (Jardim et al., 2012; Blair et al., 2013).

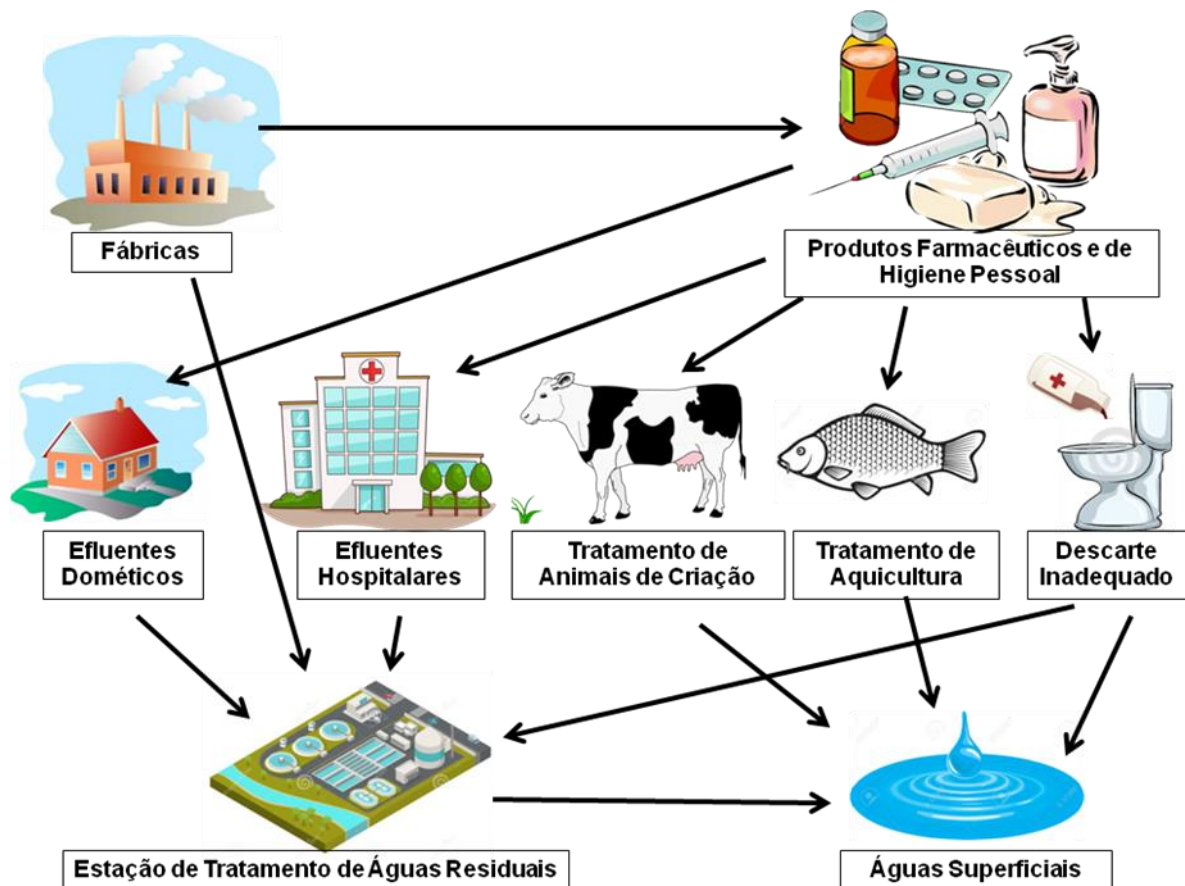


Figura 1: Possíveis fontes poluidoras de águas superficiais por produtos farmacêuticos e de higiene pessoal (baseado em Yang et al., 2014).

No Brasil, a resolução 357 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA, 2005) dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, porém não constam informações sobre os padrões de PFHP permitidos nos ecossistemas aquáticos. Já na resolução 358 (CONAMA, 2005) é discorrido sobre o tratamento e a disposição final dos resíduos dos serviços de saúde e, mais uma vez, não existem considerações sobre a presença de PFHP nos recursos hídricos, o que leva a considerar uma melhor avaliação sobre a manipulação de descarte destas substâncias diretamente ou próximas a corpos d'água. Em outros países, as legislações também enfrentam dificuldades para regulamentar tais compostos, uma

Capítulo I

vez que estes produtos químicos possuem características que exigem consideração adicional ao aplicar os critérios de qualidade de água para a proteção da vida aquática, como, por exemplo, a baixa toxicidade e interferência na reprodução (USEPA, 2016).

A presença de contaminantes emergentes em ecossistemas aquáticos vem sendo pesquisada desde a década de 1960, quando as metodologias analíticas se tornaram sensíveis o suficiente para identificar esses compostos (Noguera-Oviedo e Aga, 2016). Contudo, os avanços das metodologias para a detecção destes micropoluentes também expôs a ineficiência dos tratamentos de águas residuais em eliminar estas substâncias, uma vez que possuem alta persistência e constante introdução no ambiente aquático (Luo et al., 2014). Por isso, diversos estudos vêm sendo desenvolvidos para investigar quais são os principais contaminantes emergentes presentes nos ambientes aquáticos, e dois compostos que têm sido frequentemente encontrados são a cafeína e o triclosan (Sodré et al., 2010; Blair et al., 2013; Luo et al., 2014; Montagner et al., 2014a; López-Doval et al., 2017).

Tabela 1: Concentrações médias (ng.L^{-1}) de cafeína e triclosan encontradas em amostras de águas superficiais de diversos países.

Países	Cafeína	Referência	Triclosan	Referência
	220	Sodré et al. (2010)	66	Montagner et al. (2014a)
Brasil	17 - 4726	López-Doval et al. (2017)	22	López-Doval et al. (2017)
	73080	Campanha et al. (2015)	86,9	Campanha et al. (2015)
Alemanha	143	Musolff et al. (2009)	100	Von der Ohe et al. (2012)
China	23,8 – 625,5	Zhu et al. (2013)	6,5 - 478	Zhao et al. (2010)
Espanha	2991	Huerta-Fontela et al. (2007)	45	Kuster et al. (2008)
EUA	190	Stackelberg et al. (2007)	178,3	Perez et al. (2013)
	310	Blair et al. (2013)	97	Blair et al. (2013)
Itália	1056	Loos et al. (2007)	15	Loos et al. (2007)

Capítulo I

1.2 Cafeína

A cafeína (1,3,7-trimetilxantina) é uma substância alcaloide que pode ser extraída de sementes, folhas e frutos de mais de 60 plantas, incluindo cacau (*Theobroma cacao*), erva-mate (*Ilex paraguariensis*), guaraná (*Paullinia cupana*) e café (*Coffea arabica* e *C. robusta*), sendo esta última considerada a principal fonte de cafeína no mundo (Heckman et al., 2010; Banerjee et al., 2014). Sua produção mundial equivale a aproximadamente 10 a 15 mil toneladas por ano e sua comercialização ocorre principalmente na forma de alimentos e bebidas ou associada a fármacos (Montagner et al., 2014b). O seu amplo consumo está relacionado aos seus efeitos estimulantes no sistema nervoso central, refletindo na redução da fadiga e aumento da concentração, estado de alerta e resistência física, além de recentes estudos terem demonstrado sua contribuição na perda de peso (Heckman et al., 2010).

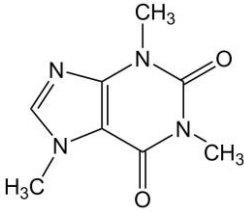
Apesar de seus benefícios à saúde humana, a cafeína vem se destacando como um dos principais contaminantes de ambientes aquáticos, devido às suas características físico-químicas, como alta solubilidade em água e baixa volatilidade, além da facilidade de entrada nos corpos hídricos através do esgoto doméstico (Montagner et al., 2014b; Edwards et al., 2015). Estudos de monitoramento de ambientes aquáticos dulcícolas apontam a alta incidência de amostras contendo cafeína com concentrações que variam de 0,001 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ a 753 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Petrovic et al., 2003; Canela et al., 2014). Diante disso, a cafeína é apontada como um potencial marcador químico para a identificação de contaminação antrópica (Montagner et al., 2014b).

A partir do momento em que a cafeína alcança um ambiente hídrico, pode haver uma interação com a biota local, por isso se faz necessário uma avaliação dos possíveis efeitos da cafeína para estes organismos. Por seus principais efeitos em mamíferos estarem relacionados ao sistema nervoso, para animais aquáticos os trabalhos relacionando a cafeína e biomarcadores neurológicos e comportamentais são relativamente mais abordados na literatura (Li et al., 2012; Richendrfer et al., 2012; Rodriguez et al., 2014; Ladu et al., 2015). Contudo, ainda é necessário explorar outros possíveis efeitos da cafeína, principalmente alterações a nível subcelular, o qual pode ser usado como importante ferramenta para avaliar precocemente os efeitos da cafeína para uma espécie, comunidades ou ecossistemas (Lam, 2009). Alguns trabalhos envolvem a investigação de alterações

Capítulo I

feitas pela cafeína em enzimas de biotransformação e danos oxidativos em invertebrados aquáticos (Aguirre-Martínez et al., 2015; Aguirre-Martínez et al., 2016; Cruz et al., 2016), mas ainda são poucos os que abrangem espécies de peixes (Li et al., 2012).

Quadro 1: Estrutura química e propriedades físicas e químicas da cafeína.

Estrutura química	
Fórmula	$C_8H_{10}N_4O_2$
CAS	58-08-2
Peso molecular	$194,2 \text{ g.mol}^{-1}$
Solubilidade em água (20°C)	$21,7 \text{ g.L}^{-1}$
Coefficiente de partição octanol-água (Kow)	0,01
Constante de dissociação ácida (pK_a)	10,1
Ponto de fusão	235 °C

Extraído de: Raimundo, C.C.M., 2011.

1.3 Triclosan

O triclosan (5-cloro-2-(2,4-diclorofenoxi)-fenol) é um agente antimicrobiano utilizado em produtos de higiene pessoal (incluindo sabonetes, desodorantes, pastas de dentes, entre outros) em concentrações próximas de 0,1 a 0,3% (Sabaliunas et al., 2003; Liang et al., 2013). Foi sintetizado pela primeira vez no início da década de 1960 pela empresa suíça Ciba-Geigy e desde então tem sido empregado como um dos principais princípios ativos de produtos bactericidas em diversos países (Jones et al., 2000; Dann; Hotela, 2011). Este composto atua interferindo na síntese de ácidos graxos, bloqueando a atividade da FabI (carreadora de enoil-acila redutase), o que resulta em danos na membrana plasmática de bactérias (McMurry et al., 1998; Russel, 2004; Escalada et al., 2005). Sendo assim, o triclosan possui alta eficiência

Capítulo I

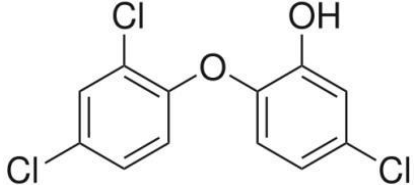
microbicida, atingindo um amplo espectro, incluindo bactérias gram positivas e gram negativas (Escalada et al., 2005).

Ao contrário da cafeína que tem como principal organismo-alvo a espécie humana, o triclosan foi sintetizado para agir contra organismos procariontes e, por isso, os primeiros estudos relacionados a este composto foram associados a sua letalidade para micro-organismos e sua toxicidade para mamíferos (Bhargava e Leonard, 1996). Contudo, a partir do momento em que o triclosan se tornou uma preocupação ecológica por se tratar de um contaminante emergente de ambientes aquáticos, estudos sobre seus efeitos em outros organismos passaram a ser relevantes (Dan e Hontela, 2011). Alguns trabalhos já demonstram os efeitos do triclosan em organismos aquáticos invertebrados (Lin et al., 2010; Bineli et al., 2011; Cortez et al., 2012) e em peixes (Liang et al., 2013; Ku et al., 2014; Escarrone et al., 2016), mas ainda é necessário entender melhor em quais vias metabólicas o triclosan pode influenciar.

A contaminação aquática por triclosan no Brasil já foi relatada por Montagner e colaboradores (2014a) em um trabalho feito em rios do estado de São Paulo, no qual os autores encontraram concentrações próximas a 66 ng.L^{-1} . No mesmo trabalho, os autores revisaram trabalhos desde o início dos anos 2000, onde pesquisadores de várias partes do mundo mostraram a presença de triclosan em águas superficiais em concentrações que variaram de 0,2 a 478 ng.L^{-1} . Como pode ser percebida, a contaminação por triclosan não é uma questão particular de um determinado país e medidas devem ser tomadas o mais rápido possível. Alguns países já restringiram o uso de triclosan em determinadas ocasiões, como por exemplo, o Japão que proibiu a presença do composto em cosméticos ou a Alemanha que baniu seu uso em plásticos (Lee et al., 2013). No Brasil, a resolução RDC nº 79/2000 permite a concentração máxima de 0,3% de triclosan para produtos cosméticos, de higiene e perfumes (ANVISA, 2000). Porém, em todos estes casos, a preocupação maior é com a resistência a bactérias que o triclosan poderia ocasionar, e não à poluição aquática.

Capítulo I

Quadro 2: Estrutura química e propriedades físicas e químicas do triclosan.

Estrutura química	
Fórmula	$C_{12}H_7Cl_3O_2$
CAS	3380-34-5
Peso molecular	289,5 g.mol ⁻¹
Solubilidade em água (20°C)	10 mg.L ⁻¹
Coefficiente de partição octanol-água (Kow)	4,8
Constante de dissociação ácida (pK_a)	7,8
Ponto de fusão	180 °C

Extraído de: Raimundo, C.C.M., 2011.

1.4 Monitoramento de Ecossistemas Aquáticos Contaminados

1.4.1 O uso de biomarcadores

A detecção da presença ou não de contaminantes emergentes na água não é o suficiente para prevenir ou remediar alterações ecológicas mais graves, pois, além da investigação qualitativa e quantitativa do contaminante, também deve ser considerada se a concentração presente é segura para os diferentes organismos daquele ecossistema. Exemplo disso são algumas substâncias orgânicas e inorgânicas já previstas na legislação brasileira (CONAMA, 2005) que possuem uma concentração máxima permitida, mas que já demonstraram causar efeitos adversos em peixes (Santos e Martinez, 2012; Moreno et al., 2014; Silva e Martinez, 2014; Simonato et al., 2016).

Atualmente, o monitoramento ambiental ideal é aquele que associa as análises químicas e físicas da água a parâmetros biológicos, tornando possível um escaneamento precoce de um local contaminado, antes que ocorram danos

Capítulo I

irreversíveis (Nikinmaa, 2014). Um exemplo é o uso de biomarcadores que, através de alterações na fisiologia normal de um organismo, torna-se possível a determinação de efeitos em resposta à presença de um xenobiótico (Lam, 2009; Nikinmaa, 2014). Os biomarcadores podem ser aplicados em pesquisas de campo, nas quais servem para dar uma visão geral da situação local, ou seja, se o ambiente está passando por algum tipo de contaminação e o quão isto está influenciando a biota local. Mas, pode-se utilizar biomarcadores em bioensaios laboratoriais, nos quais o organismo-teste é submetido a condições monitoradas e a variante é determinada pelo pesquisador, sendo assim, os efeitos de determinado contaminante para aquele organismo são melhores investigados (Smolders et al., 2004).

Para contaminantes emergentes, alguns estudos utilizando biomarcadores foram aplicados em invertebrados e vertebrados (Nassef et al., 2009; Pal et al., 2010; Dan e Hontela, 2011; Li et al., 2012; Bang et al., 2015), demonstrando que já existe um interesse em compreender melhor a ação desses compostos em organismos aquáticos. A utilização de diversos tipos de biomarcadores permite entender como cada agente tóxico age em um determinado organismo e como este tenta eliminar e/ou amenizar seus efeitos, avaliando-se quais mudanças biológicas foram causadas pelo xenobiótico (Li et al., 2012; Nikinmaa, 2014). A escolha dos biomarcadores que serão aplicados nestes estudos dependerá de quais podem descrever melhor a rota de ação e detoxificação do xenobiótico em questão para o organismo-teste (Salamant e Zarie, 2012).

Os biomarcadores bioquímicos são amplamente utilizados em ensaio ecotoxicológicos por apresentarem respostas rápidas à exposição, serem de fácil determinação, possuírem alta especificidade a determinados contaminantes e demonstrarem uma relação de resposta dose-dependente (Van der Oost et al., 2003; Lam, 2009; Nikinmaa, 2014). Enzimas envolvidas na biotransformação de compostos endógenos e exógenos (Figura 2), como é o caso das enzimas etoxiresorufina-O-desetilase (EROD) e a glutathiona S-transferase (GST), são excelentes biomarcadores por estarem intimamente ligadas à detoxificação do organismo perante um contaminante, demonstrando como um xenobiótico pode influenciar neste mecanismo (Van der Oost et al., 2003).

Capítulo I



Figura 2: Biotransformação de compostos exógenos (Baseado em Van der Oost et al., 2003; Nikinmaa, 2014).

O processo de biotransformação de xenobióticos, bem como o metabolismo celular basal, podem gerar espécies reativas de oxigênio (ERO), tais como ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o radical hidroxil ($\cdot OH$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que são moléculas envolvidas em alguns processos fisiológicos, mas também capazes de causar danos ao organismo (Valavanidis et al., 2006). Contudo, o organismo se dispõe de mecanismos para a neutralização de ERO, os quais são: i) remoção catalítica de ERO por antioxidantes enzimáticos e tióis-específicos, ii) ligação de proteínas a íons metálicos pró-oxidantes, iii) proteção contra danos de macromoléculas por proteínas e, iv) redução de radicais livres por doadores de elétrons (Limón-Pacheco e Gonsebatt, 2009). Em particular, as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutaciona peroxidase (GPx), glutaciona redutase (GR) e o tripeptídeo glutaciona reduzida (GSH) são os principais componentes celulares responsáveis pela manutenção do sistema antioxidante, e usualmente são escolhidos como biomarcadores para investigar o estado de estresse oxidativo (Figura 3) (Hermes-Lima, 2004; Colin et al., 2016).

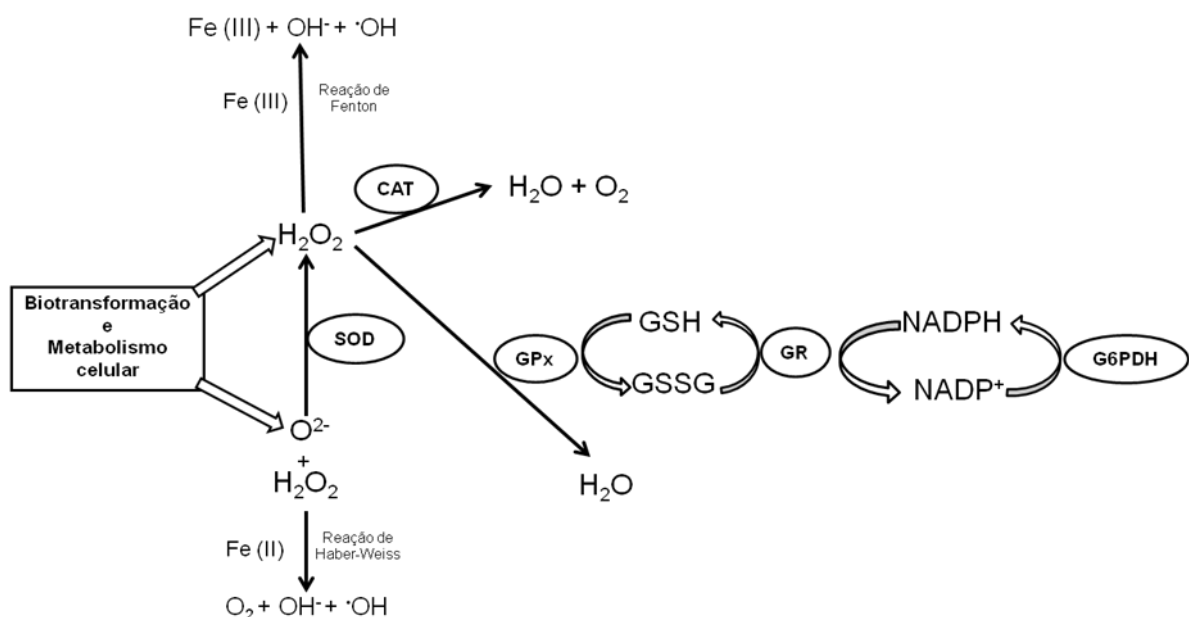


Figura 3: Neutralização de espécies reativas de oxigênio através de algumas enzimas antioxidantes e antioxidante não-enzimático (Adaptado de HERMES-LIMA, 2004).

Capítulo I

O estresse oxidativo é instalado quando a produção de ERO excede a capacidade de um organismo de neutralizar essas espécies reativas, podendo ocasionar danos em lipídios, proteínas e na molécula de DNA (Lesser, 2012). Alguns ensaios são capazes de avaliar estes danos oxidativos e também podem ser utilizados como biomarcadores, como, por exemplo, o teste de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), o qual mede a formação de malondialdeído (MDA) que é um subproduto da peroxidação lipídica (Federici et al., 2007). Outro teste que mensura danos ocasionados pelo estresse oxidativo é o teste para modificação de proteínas através de carbonilação, que determina a presença de grupamentos carbonila na amostra (Levine et al., 1994). Para avaliar os danos no DNA, consequentes ou não do estresse oxidativo, pode-se utilizar o ensaio do cometa, um teste sensível e capaz de demonstrar as quebras nas ligações da molécula de DNA, que são consideradas efeitos subletais de poluentes nas células (Ohe et al., 2004).

Além destes parâmetros bioquímicos e genéticos, alguns biomarcadores fisiológicos aplicados em animais aquáticos são capazes de demonstrar a sensibilidade do organismo frente a um contaminante. Alterações nos níveis de cortisol no plasma, que pode ser uma resposta a um estímulo estressor, faz com que ocorra um aumento na frequência cardíaca e respiratória, além de um aumento na glicemia, a fim de concentrar energias para se adaptar à condição de estresse. Sendo assim, os efeitos da resposta ao estresse também são ferramentas úteis na ecotoxicologia (Van der Oost et al., 2003; Ramesh et al., 2009). O sangue também pode dizer muito sobre a saúde do animal, uma vez que xenobióticos podem afetar a produção, função e sobrevivência dos eritrócitos dos peixes, refletindo no aumento ou decréscimo do hematócrito (porcentagem de células vermelhas no volume total do sangue), da concentração de hemoglobina ou número total de hemácias (RBC) (Martinez e Cólus, 2002; Bloom e Brandt, 2008).

Por serem organismos hiperosmóticos em relação ao meio, peixes dulcícolas apresentam biomarcadores capazes de demonstrar se um poluente está interferindo na sua capacidade em manter seu equilíbrio osmótico e iônico. A tomada ativa de íons por ATPases, pode ser influenciada pela presença de determinados contaminantes, o que prejudica a homeostase do organismo (Evans et al., 2005). A manutenção do equilíbrio ácido-base das células também é essencial para o funcionamento normal do organismo, portanto, as atividades da H⁺-ATPase e da

Capítulo I

anidrase carbônica são constantemente usadas como biomarcadores, além de estarem intimamente ligadas à regulação iônica celular (Gilmour e Perry, 2009).

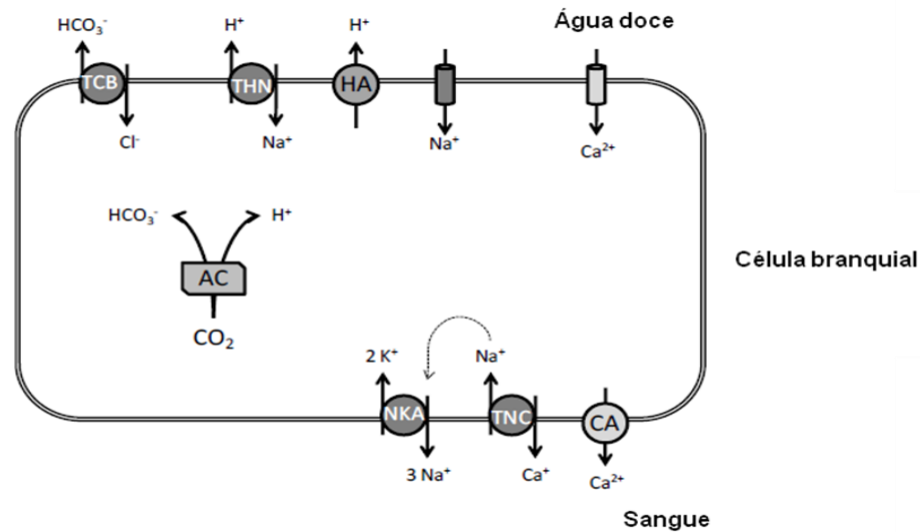


Figura 4: Modelo simplificado de uma célula rica em mitocôndria de brânquia de teleostes dulcícolas. TCB = trocador Cl⁻/HCO₃⁻; THN = trocador Na⁺/H⁺; HA = H⁺-ATPase; AC = anidrase carbônica; NKA = Na⁺/K⁺-ATPase; TNC = trocador Na⁺/Ca²⁺; CA = Ca²⁺-ATPase (Evans et al., 2005).

Outros parâmetros bioquímicos, como enzimas relacionadas a neurotransmissores, podem ser utilizados como biomarcadores, como é o caso da atividade da acetilcolinesterase, uma enzima responsável pela hidrólise do neurotransmissor acetilcolina em colina e ácido acético, evitando assim a ação contínua da acetilcolina e mantendo o funcionamento normal dos sistemas sensorial e neuromuscular (Van der Oost et al., 2003; Sarkar et al., 2006). Muitas vezes o mau funcionamento dos neurotransmissores decorrente da contaminação pode afetar o comportamento do animal, trazendo prejuízos não só para o indivíduo, mas para a população como um todo. Atualmente, estudos sobre o comportamento de peixes expostos a poluentes são ferramentas na ecotoxicologia que visam caracterizar melhor como estes compostos atuam na forma de interação das comunidades aquáticas e o ambiente (Scott e Sloman, 2004; Colin et al., 2016).

A aplicação desse conjunto de biomarcadores bioquímicos, fisiológicos e comportamentais na investigação dos efeitos de um contaminante para uma espécie não-alvo pode contribuir com o fornecimento de informações de como substâncias descartadas nos ambientes aquáticos interagem com os organismos afetando toda uma comunidade.

Capítulo I

1.4.2 *Prochilodus lineatus* como espécie sentinela

Peixes são comumente empregados como espécie sentinela em ensaios ecotoxicológicos por apresentarem alterações em parâmetros utilizados como biomarcadores, mesmo diante de baixas concentrações de um poluente (Van der Oost et al., 2003). Alguns critérios ao se escolher um organismo-teste para a investigação de efeitos de substâncias precisam ser levados em consideração, como por exemplo, a facilidade de manutenção em laboratório, o conhecimento sobre sua biologia (fisiologia, genoma e comportamento) e a sensibilidade em presença de um contaminante (Nikinmaa, 2014).

O peixe *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) é uma espécie que vem se destacando nos estudos ecotoxicológicos realizados na América do Sul, por ser um animal nativo da região Neotropical e por já ter se demonstrado sensível em ensaios *in situ* (Camargo e Martinez, 2007; Cazenave et al., 2009; Vieira et al., 2016) e laboratoriais (Santos e Martinez, 2012; Palermo et al., 2015; Simonato et al., 2016). Conhecido como curimba ou curimbatá, no Brasil este peixe é encontrado em diversas bacias hidrográficas e, em alguns rios, é uma das espécies mais abundante do local (Shibatta et al., 2007), o que se torna uma excelente característica para utilizá-lo como espécie sentinela para monitoramento ambiental. Concomitantemente, seu hábito detritívoro favorece sua exposição a qualquer tipo de substância que possa estar depositada no sedimento, incluindo compostos tóxicos, o que deve ser levado em consideração ao se escolher uma espécie bioindicadora (Martinez e Cólus, 2002).

Para ensaios laboratoriais, o curimba possui a vantagem de apresentar alterações em diversos parâmetros quando exposto a diferentes contaminantes. Estudos demonstraram que metais são capazes de interferir na osmorregulação de *P. lineatus*, mesmo em concentrações permitidas de serem encontradas nos ecossistemas aquáticos pela legislação brasileira (Ribeiro et al., 2014; Simonato et al., 2016). Contaminantes orgânicos como agrotóxicos também foram capazes de ocasionar alterações em enzimas importantes para a detoxificação do organismo de *P. lineatus*, além de induzirem a fragmentação de DNA (Santos e Martinez, 2012; Moreno et al., 2014). Contudo, estudos que demonstram a sensibilidade de *P. lineatus* a contaminantes emergentes são praticamente inexistentes até o momento (Navarro e Martinez, 2014; Miranda et al., 2016).

Capítulo I

2 JUSTIFICATIVA

Os produtos farmacêuticos e de higiene pessoal (PFHP) são substâncias de uso cotidiano e entende-se que são indispensáveis para uma melhor qualidade de vida. Contudo, seu consumo excessivo gera muitos resíduos que acabam alcançando os ecossistemas aquáticos, uma vez que o lançamento destes compostos é contínuo e os tratamentos de esgotos são praticamente ineficientes para estas substâncias. Por mais que estes contaminantes sejam considerados micropoluentes, por serem detectados em escalas de ng.L^{-1} e $\mu\text{g.L}^{-1}$, a frequência com que são encontrados gera uma preocupação a mais sobre a qualidade dos ambientes aquáticos. Portanto, a regulamentação do descarte de contaminantes emergentes em corpos d'água precisa ocorrer urgentemente.

A cafeína e o triclosan são contaminantes emergentes que podem ser considerados potenciais poluentes de ambientes aquáticos dulcícolas, uma vez que ambos são frequentemente identificados em estudos de monitoramento ambiental. A cafeína, por estar presente na segunda bebida mais consumida mundialmente, o café, o qual muitas vezes é descartado sem ter sido ingerido e metabolizado. O triclosan, por sua vez, é um bactericida tão eficaz que é acrescido em produtos de uso cotidiano, como desodorantes e pasta de dentes, e estes também escoam diretamente no esgoto. Por isso, é necessário entender quais as possíveis consequências da presença destas substâncias para a biota aquática.

A investigação dos efeitos de PFHP deve ser realizada em um maior número de espécies possíveis e, de preferência, de localidades e nichos ecológicos variados. O uso de espécies nativas da região de origem da pesquisa é de extrema importância, pois algumas espécies são mais sensíveis que outras, além de que os contaminantes podem agir de maneira diferente dependendo do organismo. As concentrações testadas também são de grande relevância, uma vez que dependendo da quantidade de contaminante, este pode atuar de maneiras diferentes. Também é interessante simular concentrações que realmente estão presentes nos ecossistemas. Outro detalhe que deve ser levado em consideração é o tipo de biomarcador utilizado e os tecidos onde serão analisados, pois os contaminantes podem influenciar vias metabólicas e mecanismos fisiológicos variados.

Capítulo I

Diante disso, o presente trabalho pretende contribuir com a análise dos efeitos dos contaminantes emergentes cafeína e triclosan a partir de experimentos que contemplem concentrações que sejam próximas às já relatadas em estudos brasileiros e que busquem indicar quais seriam as concentrações com menor periculosidade para as espécies aquáticas, por meio da exploração de diferentes biomarcadores e em tempos de exposição agudos, os quais representem a rapidez que estes compostos podem afetar a homeostase dos organismos. Portanto, estudos abrangendo diferentes biomarcadores e que explorem várias concentrações, em diferentes períodos de exposição, devem contribuir grandemente para o entendimento do modo de ação dos PFHP em organismos aquáticos, agregando subsídios para a regulamentação de concentrações seguras para o descarte destas substâncias nos sistemas hídricos.

3 HIPÓTESES

- O peixe *Prochilodus lineatus* será sensível aos contaminantes emergentes cafeína e triclosan, mesmo em baixas concentrações, podendo assim ser utilizado como modelo biológico para estudos que investiguem os efeitos destes contaminantes.
- Os efeitos da cafeína e triclosan serão detectados principalmente no fígado dos peixes, devido ao fato de se tratar de órgão importante para a metabolização de compostos orgânicos o que poderá levar a um estado de estresse oxidativo após as 168 horas de exposição.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos de dois contaminantes emergentes, a cafeína e o triclosan, para o teleósteo *Prochilodus lineatus* após exposições de 24 e 168 horas, visando contribuir com subsídios para a regulamentação desses compostos em futuras legislações.

Capítulo I

4.2 Objetivos Específicos

- Determinar se estes contaminantes emergentes interferem na atividade de enzimas de biotransformação e nas defesas antioxidantes de fígado e cérebro de *P. lineatus*;
- Averiguar a ocorrência de danos oxidativos no cérebro e fígado de *P. lineatus* causados pela exposição à cafeína e ao triclosan;
- Verificar se a cafeína e o triclosan causam efeitos genotóxicos em eritrócitos de *P. lineatus*;
- Examinar se os contaminantes em questão causam modificações na atividade da acetilcolinesterase de cérebro e músculo de *P. lineatus*;
- Investigar se ocorrem alterações comportamentais em *P. lineatus* expostos à água contendo cafeína;
- Analisar se a cafeína e o triclosan alteram os processos osmorregulatórios e regulação do pH em brânquias de *P. lineatus*, bem como nas concentrações plasmáticas de íons (sódio, potássio, cloreto e cálcio) e glicose.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIRRE-MARTÍNEZ, G.V.; DELVALLS, A.T.; MARTÍN-DÍAZ, M.L. Yes, caffeine, ibuprofen, carbamazepine, novobiocin and tamoxifen have an effect on *Corbicula fluminea* (Müller, 1774). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 120, p. 142–154, 2015.

AGUIRRE-MARTÍNEZ, G.V.; DELVALLS, A.T.; MARTÍN-DÍAZ, M.L. General stress, detoxification pathways, neurotoxicity and genotoxicity evaluated in *Ruditapes philippinarum* exposed to human pharmaceuticals. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 124, p. 18-31, 2016.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada nº 79 de 28 de agosto de 2000. Disponível em: <<http://www.portalanvisa.gov.br/documentos/10181>>. Acesso em: 21 jun. 2017.

Capítulo I

BANERJEE, P.; ALI, Z.; LEVINE, B.; FOWLER, D.R. Fatal caffeine intoxication: a series of eight cases from 1999 to 2009. *Journal of Forensic Science*, v. 59, n. 3, p. 865-868, 2014.

BANG, S.H.; AHN, J.; HONG, N.; SEKHON, S.S.; KIM, Y.; MIN, J. Acute and chronic toxicity assessment and the gene expression of Dhb, Vtg, Arnt, CYP4, and CYP314 in *Daphnia magna* exposed to pharmaceuticals. **Molecular and Cellular Toxicology**, v. 11, p. 153-160, 2015.

BHARGAVA, H.N.; LEONARD, P.A. Triclosan: applications and safety. **American Journal of Infectology Control**, v. 24, n. 3, p. 209-218, 1996.

BINELLI, A.; PAROLINI, M.; PEDRIALI, A.; PROVINI, A. Antioxidant activity in the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) in response to Triclosan exposure. **Water Air Soil Pollut**, v. 217, p. 421–430, 2011.

BLAIR, B. D.; CRAGO, J. P.; HEDMAN, C. J.; TREGUER, R. J. F.; MAGRUDER, C.; ROYER, L. S.; KLAPER, R. D. Evaluation of a model for the removal of pharmaceuticals, personal care products, and hormones from wastewater. **Science of the Total Environment**, v. 444, p. 515–521, 2013.

BLOOM, J.C.; BRANDT, J.T. Toxic response of blood. In: Casarett, L.J. et al. *Toxicology: The basic science of poisons*, ed. 7, McGraw-Hill Medical: New York, p. 455 - 484, 2008.

BOLONG, N.; ISMAIL, A. F.; SALIM, M. R.; MATSUURA, T. A review of the effects of emerging contaminants in wastewater and options for their removal. **Desalination**, v. 239, p. 229 –246, 2009.

CAMARGO, M.M.P.; MARTINEZ, C.B.R. Histopathology of gills, kidney and liver of a Neotropical fish caged in an urban stream. **Neotropical Ichthyology**, v. 5, n. 3, p. 327-336, 2007.

CANELA, M. C.; JARDIM, W. F.; SODRÉ, F. F.; GRASSI, M. T. *Caféina em águas de abastecimento público no Brasil*. São Carlos : Editora Cubo, 2014. 96 p. il.

Capítulo I

CAMPANHA, M. B.; AWAN, A. T.; SOUSA, D. N. R.; GROSSELI, G. M., MOZETO, A. A.; FADINI, P. S. A 3-year study on occurrence of emerging contaminants in an urban stream of São Paulo State of Southeast Brazil. **Environmental Science Pollutant Research**, v. 22, p. 7936 – 7947, 2015.

CAZENAVE, J.; BACCHETTA, C.; PARMA, M. J.; SCARABOTTI, P. A.; WUNDERLIN, D. A. Multiple biomarkers responses in *Prochilodus lineatus* allowed assessing changes in the water quality of Salado River basin (Santa Fe, Argentina). **Environmental Pollution**, v. 157, p. 3025 – 3033, 2009.

COLIN, N.; PORTE, C.; FERNANDES, D.; BARATA, C.; PADRÓS, F.; CARRASSÓN, M.; MONROY, M.; CANO-ROCABAYERA, O.; SOSTOA, A.; PIÑA, B.; MACEDA-VEIGA, A. Ecological relevance of biomarkers in monitoring studies of macro-invertebrates and fish in Mediterranean rivers. **Science of the Total Environment**, v. 540, p. 307 – 323, 2016.

CONAMA. Conselho Nacional do Meio Ambiente/ Ministério do Meio Ambiente. Resolução nº 357 de 17 de março de 2005. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre>>. Acesso em: 15 jul. 2016.

CONAMA. Conselho Nacional do Meio Ambiente/ Ministério do Meio Ambiente. Resolução nº 358 de 29 de abril de 2005. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre>>. Acesso em: 30 mar. 2017.

CRUZ, D.; ALMEIDA, A.; CALISTO, V.; ESTEVES, V.I.; SCHNEIDER, R.J.; WRONA, F.J.; SOARES, A.M.V.M.; FIGUEIRA, E.; FREITAS, R. Caffeine impacts in the clam *Ruditapes philippinarum*: Alterations on energy reserves, metabolic activity and oxidative stress biomarkers. **Chemosphere**, v. 160, p. 95-103, 2016.

DANN, A.B., HONTELA, A. Triclosan: environmental exposure, toxicity and mechanisms of action. **Journal of Applied Toxicology**, v. 31, p. 285 – 311, 2011.

EDWARDS, Q.A.; KULIKOV, S.M.; GARNER-O'NEALE, L.D. Caffeine in surface and wastewaters in Barbados, West Indies. **SpringerPlus**, v. 4, n. 57, p. 1-12, 2015.

Capítulo I

ESCALADA, M.G.; RUSSELL, A.D.; MAILLARD, J.Y.; OCHS, D. Triclosan–bacteria interactions: single or multiple target sites? **Letters in Applied Microbiology**, v. 41, p. 476–481, 2005.

ESCARRONE, A.L.V.; CALDAS, S.S.; PRIMEL, E.G.; MARTINS, S.E.; NERY, L.E.M. Uptake, tissue distribution and depuration of triclosan in the guppy *Poecilia vivipara* acclimated to freshwater. **Science of the Total Environment**, v. 560–561, p. 218–224, 2016.

EVANS, D.H., PIERMARINI, P.M., CHOE, K.P. The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. **Physiology Review**, v. 85, p. 97 - 177, 2005.

FEDERICI, G.; SHAW, B. J.; HANDY, R. D. Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. **Aquatic Toxicology**, v. 84, p. 415 – 430, 2007.

GILMOUR, K. M.; PERRY, S. F. Carbonic anhydrase and acid–base regulation in fish. **The Journal of Experimental Biology**, v. 212, p. 1647 – 1661, 2009.

HECKMAN, M. A.; WEIL, J.; MEJIA, E. G. Caffeine (1, 3, 7-trimethylxanthine) in Foods: A comprehensive review on consumption, functionality, safety, and regulatory matters. **Journal of Food**, v. 75, n. 3, p. 77-87, 2010.

HERMES-LIMA, M. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radical. In: STOREY, K. B. (ed.) **Functional metabolism: regulation and adaptation**. New York: John Wiley & Sons, Inc., p. 319 – 368, 2004.

HUERTA-FONTELA, M.; GALCERAN, M. T.; VENTURA, F. Ultrapformance liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of stimulatory drugs of abuse in wastewater and surface waters. **Analytical Chemistry**, v. 79, p. 3821-3829, 2007.

JARDIM, W.F.; MONTAGNER, C.C.; PESCARA, I.C.; UMBUZEIRO, G.A.; BERGAMASCO, A.M.D.D.; ELDRIDGE, M.L.; SODRÉ, F.F. An integrated approach to evaluate emerging contaminants in drinking water. **Separation and Purification Technology**, v. 84, p. 3–8, 2012.

Capítulo I

JONES, R.D.; JAMPANI, H.B.; NEWMAN, J.L.; LEE, A.S. Triclosan: A review of effectiveness and safety in health care settings. **State of the science**, v. 28, n. 2, p. 184-196, 2000.

KU, P.; WU, X.; NIE, X.; OU, R.; WANG, L.; SU, T.; LI, Y. Effects of triclosan on the detoxification system in the yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*): Expressions of CYP and GST genes and corresponding enzyme activity in phase I, II and antioxidant system. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 166, p. 105–114, 2014.

KUSTER, M.; LÓPEZ DE ALDA, M.J.; HERNANDO, M.D.; PETROVIC, M.; MARTÍN-ALONSO, J.; BARCELÓ, D. Analysis and occurrence of pharmaceuticals, estrogens, progestogens and polar pesticides in sewage treatment plant effluents, river water and drinking water in Llobregat river basin (Barcelona, Spain). **Journal of Hydrology**, v. 358, n. 1–2, p. 112–123, 2008.

LADU, F.; MWAFFO, V.; LI, J.; MACRI, S.; PORFIRI, M. Acute caffeine administration affects zebrafish response to a robotic stimulus. **Behavioural Brain Research**, v. 289, p. 48–54, 2015.

LAM, P.K.S. Use of biomarkers in environmental monitoring. **Ocean & Coastal Management**, v. 52, p. 348–354, 2009.

LEE, D.G.; CHU, K. Effects of growth substrate on triclosan biodegradation potential of oxygenase-expressing bacteria. **Chemosphere**, v. 93, n. 9, p. 1904-1911, 2013.

LESSER, M. P. Oxidative stress in tropical marine ecosystems. In: ABELE, D.; VASQUEZ-MEDINA, J. P.; ZENTENO-SAVÍN, T. **Oxidative Stress in Aquatic Ecosystems**. Wiley: Blackwell, 2012, cap 1, p. 9 – 19.

LEVINE, R. L.; WILLIAMS, J. A.; STADTMAN, E. P.; SHACTER, E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. **Methods Enzymology**, v. 233, p. 346 – 357, 1994.

LI, Z.; LU, G.; YANG, X.; WANG, C. Single and combined effects of selected pharmaceuticals at sublethal concentrations on multiple biomarkers in *Carassius auratus*. **Ecotoxicology**, v. 21, p. 353-361, 2012.

Capítulo I

LIANG, X.; NIE, X.; YING, G.; AN, T.; LI, K. Assessment of toxic effects of triclosan on the swordtail fish (*Xiphophorus helleri*) by a multi-biomarker approach. **Chemosphere**, v. 90, p. 1281–1288, 2013.

LIN, D.; ZHOU, Q.; XIE, X.; LIU, Y. Potential biochemical and genetic toxicity of triclosan as an emerging pollutant on earthworms (*Eisenia fetida*). **Chemosphere**, v. 81, p. 1328–1333, 2010.

LIMÓN-PACHECO, J.; GONSEBATT, M.E. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. **Mutation Research**, v. 674, p. 137-147, 2009.

LOOS, R.; WOLLGAST, J.; HUBER, T.; HANKE, G. Polar herbicides, pharmaceutical products, perfluorooctanesulfonate (PFOS), perfluorooctanoate (PFOA), and nonylphenol and its carboxylates and ethoxylates in surface and tap waters around Lake Maggiore in Northern Italy. **Analytical Bioanalytical Chemistry**, v. 387, p. 1469-1478, 2007.

LÓPEZ-DOVAL, J.C.; MONTAGNER, C.C.; ALBURQUERQUE, A.F.; MOSCHINI-CARLOS, V.; UMBUZEIRO, G.; POMPÊO, M. Nutrients, emerging pollutants and pesticides in a tropical urban reservoir: Spatial distributions and risk assessment. **Science of the Total Environment**, v. 575, p. 1307–1324, 2017.

LUO, Y.; GUO, W.; NGO, H. H.; NGHIEM, L. D.; HAI, F. I.; ZHANG, J.; LIANG, S.; WANG, X. C. A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. **Science of the Total Environment**, v. 473–474, p. 619–641, 2014.

MARTINEZ, C.B.R.; CÓLUS, I.M.S. Biomarcadores em peixes neotropicais para o monitoramento da poluição aquática na bacia do rio Tibagi. In: MEDRI, M. E.; BIANCHINI, E.; SHIBATTA, O. A.; PIMENTA, J. A. **A bacia do rio Tibagi**. Londrina: M. E. Medri, cap. 29, p. 551-557, 2002.

McMURRY, L.M.; OETHINGER, M.; LEVY, S.B. Triclosan targets lipid synthesis. **Nature**, v. 394, p. 531–532, 1998.

Capítulo I

MIRANDA, R.G.; GRÖTZNER, S.R.; VOIGT, C.L.; CAMPOS, S.X.; RANDI, M.A.F.; OLIVEIRA RIBEIRO, C.A.; FILIPAK NETO, F. Effects of realistic concentrations of TiO₂ and ZnO nanoparticles in *Prochilodus lineatus* juvenile fish. **Environmental Science Pollution Research**, v.23, p. 5179-5188, 2016.

MONTAGNER, C. C.; JARDIM, W. F.; VON DER OHE, P. C.; UMBUZEIRO, G. A. Occurrence and potential risk of triclosan in freshwaters of São Paulo, Brazil—the need for regulatory actions. **Environmental Science Pollution Research**, v. 21, p. 1850 – 1858, 2014.

MONTAGNER, C. C.; VIDAL, C.; SODRÉ, F. F.; PESCARA, I. C.; JARDIM, W. F. A cafeína no ambiente. In: CANELA, M. C.; JARDIM, W. F.; SODRÉ, F. F.; GRASSI, M. T. **Cafeína em águas de abastecimento público no Brasil**. São Carlos : Editora Cubo, 2014. Cap 1, p. 11 – 24.

MORENO, N.C.; SOFIA, S.H.; MARTINEZ, C.B.R. Genotoxic effects of the herbicide Roundup Transorb and its active ingredient glyphosate on the fish *Prochilodus lineatus*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 37, p. 448-454, 2014.

MUSOLFF, A.; LESCHIK, S.; MÖDER, M.; STRAUCH, G.; REINSTORF, F.; SCHIRMER, M. Temporal and spatial patterns of micropollutants in urban receiving waters. **Environmental Pollution**, v. 157, p. 3069-3077, 2009.

NASSEF, M.; MATSUMOTO, S.; SEKI, M.; KANG, I.J.; MOROISHI, J.; SHIMASAKI, Y.; OSHIMA, Y. Pharmaceuticals and Personal Care Products Toxicity to Japanese Medaka Fish (*Oryzias latipes*). **Journal of the Faculty of Agriculture, Kyushu University**, v. 54, n. 2, p. 407–411, 2009.

NAVARRO, C.D.C., MARTINEZ, C.B.R. Effects of the surfactant polyoxyethylene amine (POEA) on genotoxic, biochemical and physiological parameters of freshwater teleost *Prochilodus lineatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology, part C**, v. 165, p. 83-90, 2014.

NIKINMAA, M. Bioindicators and biomarkers. In: ____ **An introduction to aquatic toxicology**. Nova Iorque: Elsevier, 2014. Cap 12, p. 147 – 154.

Capítulo I

NOGUERA-OVIEDO, K.; AGA, D.S. Lessons learned from more than two decades of research on emerging contaminants in the environment. **Journal of Hazardous Materials**, v. 316, p. 242–251, 2016.

OHE, T.; WATANABE, T.; WAKABAYASHI, K. Mutagens in surface waters: a review. **Mutation Research**, v. 567, p.109–149, 2004.

PAL, A.; GIN, K. Y.H.; LIN, A. Y. C.; REINHARD, M. Impacts of emerging organic contaminants on freshwater resources: Review of recent occurrences, sources, fate and effects. **Science of the Total Environment**, v. 408, p. 6062 – 6069, 2010.

PALERMO, F.; RISSO, W. E.; SIMONATO, J. D.; MARTINEZ, C. B. R. Bioaccumulation of nickel and its biochemical and genotoxic effects on juveniles of the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 116, p. 19 – 28, 2015.

PEREZ, A.L.; SYLOR, M.A.; SLOCOMBE, A.J.; LEW, M.G.; UNICE, K.M.; DONOVAN, E.P. Triclosan occurrence in freshwater systems in the United States (1999–2012): a meta-analysis. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 32, n. 7, p. 1479-1487, 2013.

PETROVIC, M.; GONZALEZ, S.; BARCELO, D. Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 10, p. 685 – 696, 2003.

RAIMUNDO, C.C.M. Contaminantes emergentes em água tratada e seus mananciais: sazonalidade, remoção e atividade estrogênica. Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química, Campinas, SP, 2011.

RAMESH, M.; SRINIVASAN, R.; SARAVANAN, M. Effect of atrazine (Herbicide) on blood parameters of common carp *Cyprinus carpio* (Actinopterygii: Cypriniformes). **African Journal of Environmental Science and Technology**, v. 3, n.12, p.453-458, 2009.

RIBEIRO, A.M.; RISSO, W.E.; FERNANDES, M.N.; MARTINEZ, C.B.R. Lead accumulation and its effects on the branchial physiology of *Prochilodus lineatus*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 40, p. 645-657, 2014.

Capítulo I

RICHENDRFER, H.; PELKOWSKI, S.D.; COLWILL, R.M. On the edge: pharmacological evidence for anxiety-related behavior in zebrafish larvae. **Behavior Brain Research**, v. 228, n.1, p. 99-106, 2012.

RODRIGUEZ, R.S.; HAUGEN, R.; RUEBER, A.; HUANG, C. Reversible neuronal and muscular toxicity of caffeine in developing vertebrates. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 163, p. 47-54, 2014.

RUSSEL, A.D. Whither triclosan? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 53, p. 693-695, 2004.

SABALIUNAS, D.; WEBB, S.F.; HAUKE, A.; JACOB, M.; ECKHOFF, W.S. Environmental fate of Triclosan in the River Aire Basin, UK. **Water Research**, v. 37, p. 3145–3154, 2003.

SALAMAT, N.; ZARIE, M. Using of fish pathological alterations to assess aquatic pollution: a review. **World Journal of Fish and Marine Sciences**, v. 4, n. 3, p. 223 - 231, 2012.

SANTOS, T.G.; MARTINEZ, C.B.R. Atrazine promotes biochemical changes and DNA damage in a Neotropical fish species. **Chemosphere**, v. 89, p. 1118 – 1125, 2012.

SARKAR, A.; RAY, D.; SHRIVASTAVA, A. N.; SARKER, S. Molecular biomarkers: their significance and application in marine pollution monitoring. **Ecotoxicology**, v. 15, p. 333–340, 2006.

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

SHIBATTA, O.A.; GEALH, A.M.; BENNEMANN, S.T. Ictiofauna dos trechos alto e médio da bacia do rio Tibagi, Paraná, Brasil. **Biota Neotropica**, v. 7, n. 2, 2007.

SILVA, A.F.O.; MARTINEZ, C.B.R. Acute effects of cadmium on osmoregulation of the freshwater teleost *Prochilodus lineatus*: Enzymes activity and plasma ions. **Aquatic Toxicology**, v. 156, p.161-168, 2014.

Capítulo I

SIMONATO, J.D.; MELA, M.; DORIA, H.B.; GUILOSKI, I.C.; RANDI, M.A.F.; CARVALHO, P.S.M.; MELLETTI, P.C.; ASSIS, H.C.S; BIANCHINI, A.; MARTINEZ, C.B.R. Biomarkers of waterborne copper exposure in the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Aquatic Toxicology**, v. 170, p. 31-41, 2016.

SMOLDERS, R.; BERVOETS, L.; BLUST, R. In situ and laboratory bioassays to evaluate the impact of effluent discharges on receiving aquatic ecosystems. **Environmental Pollution**, v. 132, p. 231–243, 2004.

SODRÉ, F. F.; LOCATELLI, M. A. F.; JARDIM, W. F. Occurrence of emerging contaminants in Brazilian drinking waters: A sewage-to-tap issue. **Water Air Soil Pollution**, v. 206, p. 57 – 67, 2010.

STACKELBERG, p. E.; GIBS, G.; FURLONG, E. T.; MEYER, M. T.; ZAUGG, S. D.; LIPPINCOTT, R. L. Efficiency of conventional drinking-water-treatment processes in removal of pharmaceuticals and other organic compounds. **Science of the Total Environment**, v. 377, p. 255-272, 2007.

STUART, M.; LAPWORTH, D.; CRANE, E.; HART, A. Review of risk from potential emerging contaminants in UK groundwater. **Science of the Total Environment**, v. 416, p. 1 – 21, 2012.

USEPA. United States Environmental Protection Agency. Contaminants of Emerging Concern including Pharmaceuticals and Personal Care Products. Disponível em: <http://www.epa.gov>. acesso em: abril/2016.

VALAVANIDIS, A.; VLAHOGIANNI, T.; DASSENAKIS, M.; SCOULLOS, M. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 64, p. 178–189, 2006.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N.P.E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 13, p. 57-149, 2003.

VIEIRA, C.E.D.; COSTA, P.G.; LUNARDELLI, B.; OLIVEIRA, L.F.; CABRERA, L.C.; RISSO, W.E.; PRIMEL, E.G.; MELETTI, P.C.; FILLMANN, G.; MARTINEZ, C.B.R.

Capítulo I

Multiple biomarker responses in *Prochilodus lineatus* subjected to short-term in situ exposure to streams from agricultural areas in Southern Brazil. **Science of the Total Environment**, v. 542, p. 44–56, 2016.

VON DER OHE, P.C.; JANSEN, M.S.; SLOBODNIK, J.; BRACK, W. Triclosan – the forgotten priority substance? **Environmental Science Pollution Research**, v. 19, p. 585–591, 2012.

WILKINSON, J.L.; HOODA, P.S.; BARKER, J.; BARTON, S.; SWINDEN, J. Ecotoxic pharmaceuticals, personal care products and other emerging contaminants: A review of environmental, receptor-mediated, developmental, and epigenetic toxicity with discussion of proposed toxicity to humans. **Journal of Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 46, n. 4, 2016.

YANG, G.; FAN, M.; ZHANG, G. Emerging contaminants in surface waters in China - a short review. **Environmental Research Letters**, v. 9, p. 1-13, 201.

ZHAO, J.L.; ZHANG, Q.Q.; CHEN, F.; WANG, L.; YING, G.G.; LIU, Y.S.; YANG, B; ZHOU, L.J.; LIU, S.; SU, H.C.; ZHANG, R.Q. Evaluation of triclosan and triclocarban at river basin scale using monitoring and modeling tools: implications for controlling of urban domestic sewage discharge. **Water Research**, v. 47, p. 395–405, 2013.

ZHU, S.; CHEN, H.; LI, J. Sources, distribution and potential risks of pharmaceuticals and personal care products in Qingshan Lake basin, Eastern China. **Ecotoxicology Environmental Safety**, v. 96, p. 154-159, 2013.

CAPÍTULO II**Efeitos da cafeína para o teleósteo *Prochilodus lineatus* por meio de biomarcadores bioquímicos e genotóxicos**

Manuscrito a ser submetido para publicação no periódico **Ecotoxicology and Environmental Safety**.

Capítulo II

Efeitos da cafeína para o teleósteo *Prochilodus lineatus* por meio de biomarcadores bioquímicos e genotóxicos

Thais Graciano Santos Silva^{1*}, Cassiana Carolina Montagner Raimundo², Cláudia Bueno dos Reis Martinez¹

¹Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Estadual de Londrina, 86051-990, Londrina, Paraná, Brasil.

²Laboratório de Química Ambiental, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, 13083-970, Campinas, São Paulo, Brasil.

*autor para correspondência: thaisgsantos8@hotmail.com

RESUMO

A cafeína é uma substância amplamente consumida em produtos alimentícios e fármacos devido aos seus efeitos estimulantes em humanos. Porém, este composto está frequentemente sendo encontrado em ambientes aquáticos, levando a uma preocupação de possíveis consequências adversas para a biota aquática. Para avaliar os efeitos da cafeína, biomarcadores bioquímicos e genotóxicos foram analisados em juvenis de *Prochilodus lineatus*, espécie de peixe da região Neotropical. Para tanto, os peixes foram expostos a cafeína, nas concentrações de 0,3 µg.L⁻¹ (CAF 0,3), 3 µg.L⁻¹ (CAF 3) e 30 µg.L⁻¹ (CAF 30), ou somente à água (CTR) durante 24 h e 168 h. A exposição mais longa à cafeína promoveu redução significativa da atividade da enzima de biotransformação de fase I etoxiresorufina O-desetilase (EROD) no cérebro, mas resultou em aumento significativo da EROD hepática. Nos peixes expostos à cafeína não foram constatadas, no fígado e cérebro, alterações no conteúdo de glutathione (GSH) e na atividade da glutathione S-transferase (GST), nem danos oxidativos em lipídios e proteínas e tampouco danos no DNA em eritrócitos. Esses resultados mostram que a cafeína pode interferir no mecanismo de biotransformação de *P. lineatus* após a exposição subcrônica (168 horas) às concentrações de 3 e 30 µg.L⁻¹, mas não gera alterações significativas para desencadear um estado de estresse oxidativo.

Palavras-chave: biomarcadores, contaminante emergente, detoxificação, EROD, peixe Neotropical.

Capítulo II

1. Introdução

A cafeína (1,3,7-trimetilxantina) é uma substância branca e cristalina, de gosto amargo, encontrada naturalmente em folhas, sementes e frutos de várias plantas. Sua forma pura foi isolada pela primeira vez em 1819, a partir da planta de café, mas atualmente sua presença é conhecida em chás, chocolates, erva mate e guaraná (Banerjee et al., 2014). Seu elevado consumo se deve aos diversos efeitos já comprovados para seres humanos, principalmente ao seu potencial efeito estimulante do sistema nervoso central, o que contribui para redução da fadiga e aumento da concentração, estado de alerta e resistência física, além de recentes estudos terem demonstrado sua contribuição na perda de peso (Heckman et al., 2010).

Apesar de seus benefícios para a saúde humana, esse alto consumo da cafeína pode levar a um grave problema de contaminação aquática, uma vez que cerca de 5% da cafeína é excretada através da urina sem ocorrer metabolização e também pelo descarte de alimentos, bebidas e fármacos contendo cafeína que, através do esgoto, podem alcançar os corpos d'água (Montagner et al., 2014). Estudos de monitoramento de ambientes aquáticos dulcícolas apontam a frequência elevada de amostras contendo cafeína com concentrações que variam de 0,001 $\mu\text{g.L}^{-1}$ a 753 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Petrovic et al., 2003; Canela et al., 2014). Com isso, a cafeína pode ser classificada como contaminante emergente, o qual abrange substâncias que não estão incluídas em programas de monitoramento, mas que devem ser acrescentados em legislações futuras, uma vez que as mesmas estão sendo amplamente detectadas e podem causar danos à biota aquática (Stuart et al., 2012; USEPA, 2016).

A constante presença de cafeína em ecossistemas aquáticos vem despertando o interesse de se entender quais são seus efeitos para animais aquáticos, já que estes não são os organismos alvos desta substância. Muitos trabalhos na literatura já demonstraram os efeitos da cafeína em peixes, destacando-se pesquisas relacionadas a alterações comportamentais (Richendrfer et al., 2012; Ladu et al., 2015; Tran et al., 2017). Contudo, ainda é necessário explorar outros possíveis efeitos da cafeína, principalmente alterações a nível subcelular, o qual pode ser usado como importante ferramenta para avaliar precocemente os efeitos da cafeína para uma espécie, comunidades ou ecossistemas (Lam, 2009). Alguns trabalhos envolvem a investigação de alterações

Capítulo II

feitas pela cafeína em enzimas de biotransformação e danos oxidativos em invertebrados aquáticos (Aguirre-Martínez et al., 2015; Aguirre-Martínez et al., 2016; Cruz et al., 2016), mas ainda são poucos os que abrangem espécies de peixes (Li et al., 2012).

Sabe-se que em mamíferos as enzimas de biotransformação de fase I pertencentes ao complexo do citocromo P450 são de extrema importância para a metabolização da cafeína, uma vez que as enzimas da família CYP1A são as principais responsáveis em transformar a cafeína em paraxantina, além de outras CYP que convertem a cafeína em teobromina e teofilina. Além dessas vias de fase I, outra importante etapa na biotransformação da cafeína é a acetilação (fase II), por meio da ação da N-acetiltransferase. Essas vias atuam em conjunto para tornar a cafeína e seus metabólitos mais fáceis de serem excretados pelo organismo (Sawynok e Yaksh, 1993; Burdan et al., 2015). Em peixes, os processos de biotransformação de fase I e II são mediados, principalmente, por enzimas da família CYP1A e glutatona S-transferases, respectivamente (Van der Oost et al., 2003). Contudo, a metabolização da cafeína nesses animais ainda não está bem descrita.

Os processos de biotransformação podem gerar espécies reativas de oxigênio (ERO), que, em excesso, se tornam tóxicas para o organismo, instalando um estado de estresse oxidativo, que pode ocasionar danos em lipídios, proteínas e na molécula de DNA (Lesser, 2012). Apesar de seus efeitos antioxidantes já conhecidos para mamíferos (George et al, 1999; Azam et al, 2003), estudos com bivalves já demonstraram que a cafeína pode ocasionar um aumento de lipoperoxidação (Cruz et al., 2016) e danos em DNA (Aguirre-Martínez et al, 2015), o que mostra a necessidade de maior investigação sobre os efeitos pró-oxidantes da cafeína para organismos aquáticos.

A espécie de peixe *P. lineatus* é um excelente modelo experimental para a investigação de efeitos em enzimas relacionadas à biotransformação e promoção de danos oxidativos por contaminantes, uma vez que esta espécie possui sua fisiologia bastante conhecida e já foi comprovada sua sensibilidade a diversos poluentes aquáticos (Cazenave et al., 2009; Santos e Martinez, 2012; Palermo et al., 2015). Portanto, diante da escassez de trabalhos que descrevem a metabolização da cafeína em peixes e sabendo que esta substância já apresentou ser responsável por danos oxidativos em espécies aquáticas, o objetivo do presente trabalho foi avaliar

Capítulo II

os efeitos da cafeína para o peixe *P. lineatus* após exposições de 24 e 168 horas utilizando biomarcadores relacionados à biotransformação e estresse oxidativo.

2. Material e métodos

2.1 Desenho Experimental

Peixes em estágio juvenil da espécie *Prochilodus lineatus* (peso (g): $15,26 \pm 1,1$; comprimento padrão (cm): $9,28 \pm 0,2$; $n= 80$), obtidos da Piscicultura Aqua Norte (Cambará-PR), permaneceram sete dias em tanques de 300 L contendo água limpa, desclorada e com aeração constante para aclimação. Durante esse período foi fornecida ração comercial (Guabi®, BR) a cada 48 h, interrompendo-se a alimentação 24 h antes dos testes, bem como durante a exposição. Os parâmetros físicos e químicos da água foram monitorados durante todo o experimento (aclimação e exposição: $t = 22,78 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,065$; $\text{pH} = 8,19 \pm 0,015$; O.D. = $8,16 \text{ mg O}_2\cdot\text{L}^{-1} \pm 0,128$; condutividade = $0,116 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1} \pm 0,002$).

A partir de uma solução estoque de cafeína (99% Synth, Brasil) dissolvida em água ultrapura ($0,48 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$), foram preparados aquários contendo 80 L de água e as concentrações de 0,3; 3 e $30 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de cafeína (denominados respectivamente de CAF 0,3, CAF 3 e CAF 30). Um aquário manteve-se apenas com água desclorada (grupo CTR). Após a aclimação, grupos de 10 peixes foram transferidos para cada um dos aquários e permaneceram nestas condições durante 24 h e 168 h (com renovação total de água a cada 24 horas). Experimentos independentes foram realizados para cada tempo experimental. As concentrações de cafeína testadas estão baseadas em concentrações já encontradas em águas superficiais brasileiras (Sodré et al., 2010; Montagner et al., 2014; Campanha et al., 2015). Amostras de água dos aquários foram coletadas, em tubos falcon de 15 mL, no início de cada experimento (t_0), logo após a retirada dos peixes no experimento de 24 h e a cada renovação da água, em intervalos de 24 h, no experimento de 168 h, e armazenadas a 10°C para posterior análise da concentração de cafeína.

Após os tempos experimentais, os peixes foram anestesiados em benzocaína ($0,1\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) para a retirada de sangue pela veia caudal. Em seguida, os animais foram mortos por secção medular para a coleta do fígado e cérebro. Os órgãos foram armazenados em ultrafreezer (-80°C) para as análises bioquímicas e o sangue foi armazenado em soro bovino fetal e refrigerado (10°C) até o momento do ensaio

Capítulo II

genético. Os procedimentos descritos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (Processo CEUA nº 19618.2013.57).

2.2 Determinação da Cafeína na Água

A quantificação de cafeína nas amostras de água foi realizada sem extração prévia, utilizando-se um cromatógrafo Agilent 1200 acoplado a um espectrômetro de massa tipo triplo quádruplo Agilent 6410 com uma fonte de ionização por “electrospray”. A separação ocorreu a 25°C (coluna Zorbax SB-C18) com eluição gradiente, a partir de uma fase móvel constituída por uma solução de ácido fórmico (0,01%) em metanol a uma vazão de 0,3 mL/min. O volume de injeção foi de 10 µL. Duas transições de íons precursor-produto (m/z) foram empregadas para a determinação: 195 - 138 m/z EC= 15 eV, para a quantificação e 195 - 110 m/z EC=20 eV, para a confirmação. A tensão de fragmentação foi fixada na voltagem de 110 v. Foi feita uma curva de calibração a partir de um padrão e o limite de quantificação foi de 30 ng.L⁻¹.

2.3 Biomarcadores Bioquímicos

As amostras de fígado e cérebro mantidas no ultrafreezer foram descongeladas em temperatura ambiente, homogeneizados (10x volume) em tampão fosfato de potássio (0,1 M, pH 7,0) e centrifugadas (20 min, 13000 g, 4°C), com o sobrenadante foram realizadas as análises a seguir.

A atividade catalítica da CYP1A foi determinada pela atividade da EROD (etoxiresorufina-O-desetilase), responsável por converter 7-etoxiresorufina (fornecida no meio de reação do ensaio) em resorufina, a cada minuto, durante 10 minutos (excitação: 530 nm, emissão: 590 nm) (Eggens e Galgani, 1992). A atividade da EROD foi expressa baseada em uma curva padrão de resorufina em pmol de resorufina.minuto⁻¹.mg de proteína⁻¹. A atividade da glutathione S-transferase (GST) foi mensurada através da complexação da GSH com o substrato 1-cloro-2,3-dinitrobenzeno (CDNB) em espectrofotômetro em 340 nm (Keen et al., 1976) e expressa em nmol de CDNB conjugados.min⁻¹. mg de proteína⁻¹.

O conteúdo do tripeptídeo glutathione (GSH) foi medido por meio da reação da glutathione com o substrato 5,5'-ditiobis-2-ácido nitrobenzóico (DTNB), formando o

Capítulo II

tiolato (TNB) (Beutler et al., 1963), quantificado em 412 nm e expresso em μg de GSH.mg de proteína⁻¹.

A peroxidação lipídica foi estimada através da quantificação de um dos produtos finais da peroxidação lipídica, o malondialdeído (MDA), aplicando-se o teste das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), pela leitura de fluorescência (excitação: 530 nm, emissão: 590 nm) (Federici et al., 2007). A peroxidação lipídica foi expressa em equivalentes de MDA como μmol de MDA.mg de proteína⁻¹.

O conteúdo de grupamentos carbonila foi quantificado a partir da reação das proteínas carboniladas com o 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) em ácido clorídrico em espectrofotometro 370nm (Levine et al., 1994). O conteúdo de proteínas carboniladas foi expresso em μmol carbonila. mg de proteína⁻¹.

A concentração de proteínas totais das amostras de todos os órgãos utilizados nos ensaios bioquímicos foi determinada pelo método de Bradford (1976), baseada em uma curva padrão de albumina de soro bovino (BSA), em espectrofotômetro a 595 nm.

2.4 Biomarcador Genotóxico

Danos no DNA foram quantificados nos eritrócitos por meio do ensaio do cometa, baseado em Singh et al. (1988), com algumas modificações (Vanzella et al., 2007). As amostras de sangue diluídas em soro bovino fetal (1:100) foram misturadas em agarose de baixo ponto de fusão (0,5%), colocadas em lâminas previamente revestidas com agarose com ponto de fusão normal (1%), cobertas com lamínulas e levadas para solidificar (refrigeração 10°C). Após 40 minutos, as lamínulas foram retiradas e as lâminas foram acondicionadas em cubas protegidas da luz contendo uma solução de lise (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 1% Lauril, 10% DMSO, 1 mL Triton X-100, pH 10.0) para o isolamento do material genético (nucleoides). Passadas 2h, os nucleoides sofreram desnaturação em um tampão alcalino (3 M NaOH, 1mM EDTA, pH > 13) e foram submetidos a uma corrida de eletroforese (1 V.cm⁻¹; 300mA, 20 min) para a migração dos fragmentos e formação da cauda. Depois, as lâminas receberam lavagens (3x, 5 min) com tampão de neutralização (0,4 M Tris, pH 7,5) e posterior fixação em etanol (100%). Para as análises, as lâminas foram coradas com gel Red e analisadas em microscópio de fluorescência (filtro de excitação 450-490 nm, objetiva 40x) para a contagem de 100

Capítulo II

nucleoides por amostra, classificando-os em: classe 0 (sem danos aparentes), classe 1 (cauda com metade do diâmetro do nucleoide), classe 2 (cauda com 1 a 2 vezes o diâmetro do nucleoide) e classe 3 (cauda maior que 2x o diâmetro do nucleoide). O escore de danos de cada amostra foi calculado a partir da fórmula (\sum nº de nucleoides em cada classe x valor da classe).

2.5 Análises Estatísticas

Considerando-se que foram experimentos independentes para cada tempo experimental (24 h e 168 h), os resultados só foram comparados entre os diferentes tratamentos, para um mesmo tempo de exposição. Para cada biomarcador foi feita a comparação entre os grupos experimentais (CTR, CAF 0,3; CAF 3 e CAF 30) por meio de análise de variância paramétrica (ANOVA) ou não-paramétrica (Kruskall-Wallis), de acordo com a distribuição dos dados (normalidade e homogeneidade de variância). Quando indicado, as diferenças entre os grupos foram localizadas pelos testes Student-Newman-Keuls e Dunn's. Foram considerados significativos valores de $P < 0,05$.

3. Resultados

3.1 Determinação da Cafeína na água

As concentrações de cafeína determinadas nas amostras de água dos aquários coletadas durante a exposição estão representadas na Tabela 1 e mostraram-se maiores do que suas respectivas concentrações nominais (0,3, 3 e 30 $\mu\text{g.L}^{-1}$). Apesar das variações entre as concentrações nominais e determinadas de, aproximadamente, 60% para o aquário CAF 0,3; de 7% para o aquário CAF 3 e de 25% para o aquário CAF 30, optou-se em manter os nomes das concentrações nominais. Também observou-se uma variação na concentração do t 0h para o t 24 de aproximadamente 2% para todos os tratamentos.

Tabela 1 – Concentração de cafeína ($\mu\text{g.L}^{-1}$) na água dos aquários experimentais no início das exposições (t 0h) e após 24 h (t 24h) de cada renovação, durante todo o experimento (24 e 168h).

	CTR	CAF 0,3	CAF 3	CAF 30
t 0h	N.D.	0,493 ± 0,11	3,187 ± 0,03	38,330 ± 0,23
t 24h	N.D.	0,487 ± 0,08	3,222 ± 0,03	37,588 ± 0,07

Valores de média ± erro padrão. N= 6. N.D. = não detectado.

Capítulo II

3.2 Biomarcadores Bioquímicos

A atividade enzimática da etoxiresorufina-O-desetilase (EROD) não apresentou alteração no cérebro dos peixes expostos à cafeína durante 24 horas. Contudo, em 168 horas, os peixes dos grupos CAF 3 e CAF 30 demonstraram uma atividade reduzida em relação ao CTR (Figura 1A). No fígado dos peixes do experimento de 24 horas não ocorreu alteração na atividade da EROD, porém após 168 horas, a atividade hepática da EROD dos peixes do grupo CAF 30 aumentou significativamente em comparação ao CTR (Figura 1B). Para a atividade da glutathiona S-transferase (GST), não foi observada nenhuma modificação significativa (Figura 1C e 1D).

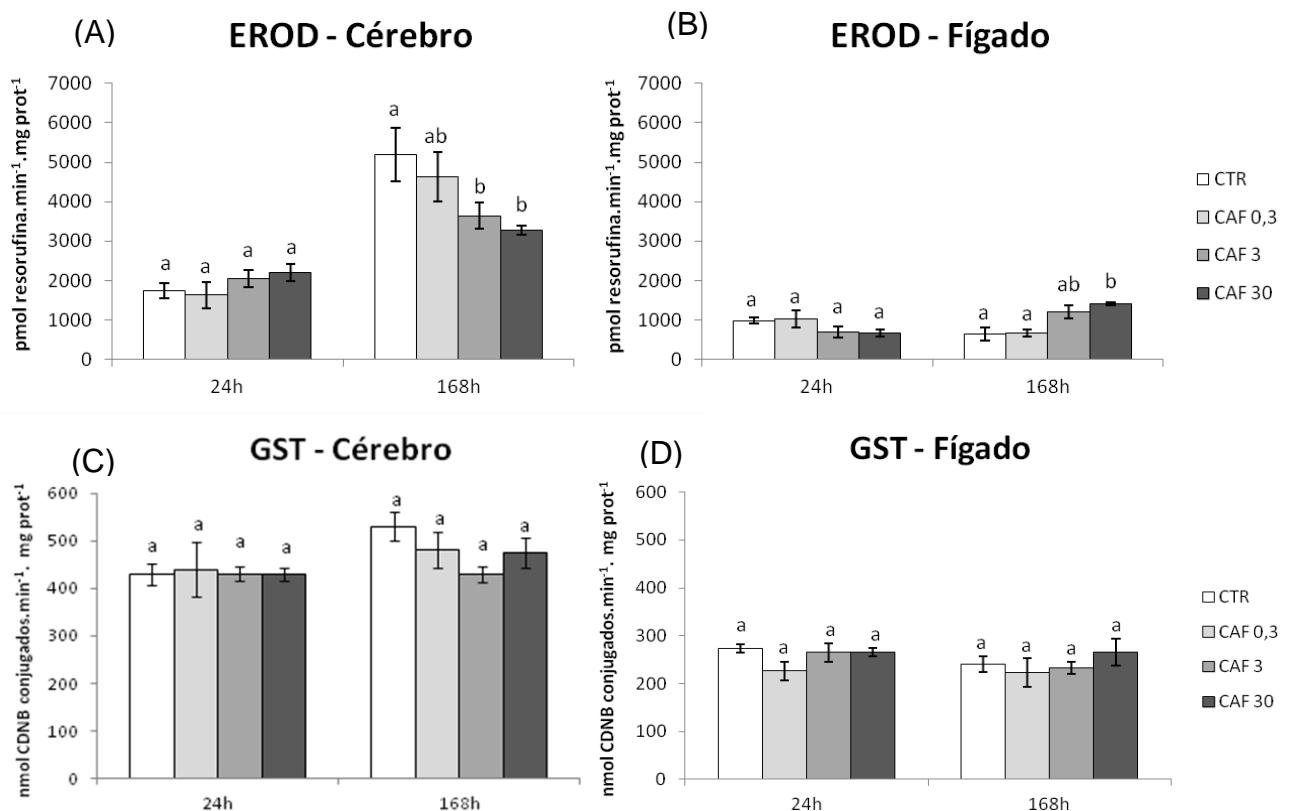


Figura 1: Atividade das enzimas de biotransformação EROD e GST em cérebro (A e C) e fígado (B e D) de *Prochilodus lineatus* após exposição a 0,3; 3 ou 30 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de cafeína (CAF 0,3; CAF 3 e CAF 30, respectivamente) ou somente a água (CTR), por 24 horas e 168 horas ($\bar{x} \pm \text{EP}$; N= 8 a 10). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos para um mesmo tempo de exposição ($P < 0.05$).

Capítulo II

Os conteúdos de glutatona (GSH) cerebral (Figura 2A) e hepática (Figura 2B) não apresentaram diferença significativa entre os grupos testados nos dois tempos experimentais.

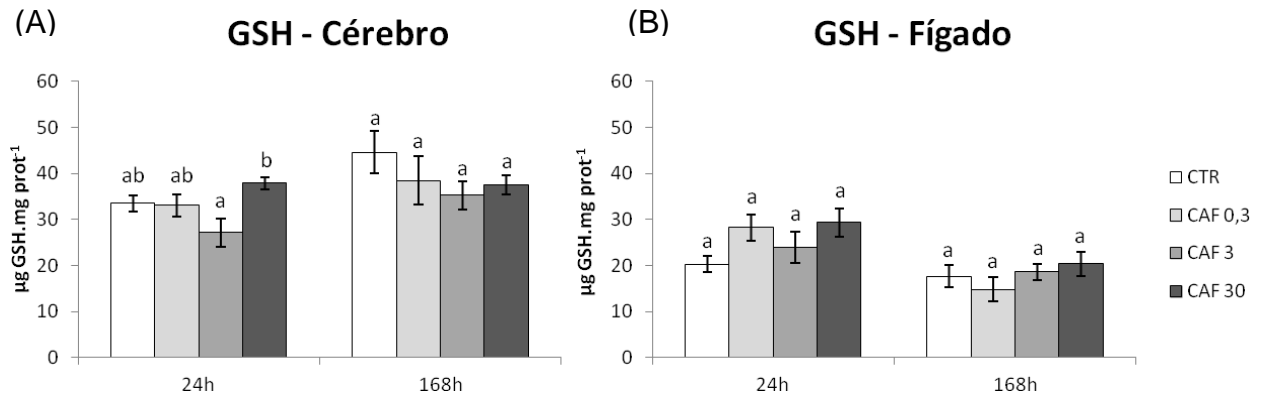


Figura 2: Conteúdo de glutatona (GSH) em cérebro (A) e fígado (B) de *Prochilodus lineatus* após exposição a 0,3; 3 ou 30 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de cafeína (CAF 0,3; CAF 3 e CAF 30, respectivamente) ou somente a água (CTR) por 24 horas e 168 horas ($\bar{x} \pm \text{EP}$; N= 8 a 10). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos para um mesmo tempo de exposição ($P < 0,05$).

Os peixes não apresentaram peroxidação lipídica nos tecidos cerebrais (Figura 3A) e hepáticos (Figura 3B) quando expostos durante 24 e 168 horas à cafeína.

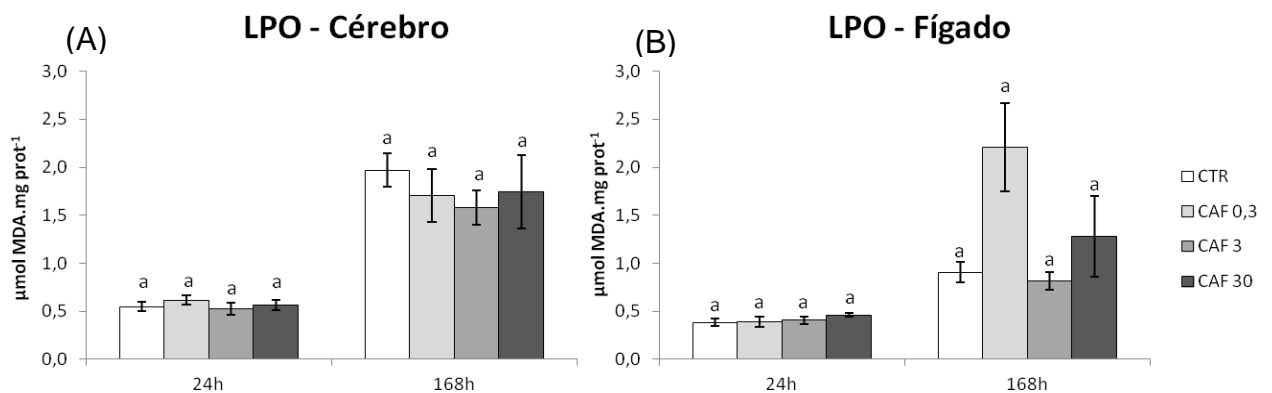


Figura 3: Peroxidação lipídica (LPO) em cérebro (A) e fígado (B) de *Prochilodus lineatus* após exposição a 0,3; 3 ou 30 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de cafeína (CAF 0,3; CAF 3 e CAF 30, respectivamente) ou somente a água (CTR) por 24 horas e 168 horas ($\bar{x} \pm \text{EP}$; N= 8 a 10). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos para um mesmo tempo de exposição ($P < 0,05$).

Capítulo II

A cafeína não causou aumento de carbonilação de proteínas no cérebro de *P. lineatus* em 24 h de exposição e em 168 h não foi possível realizar o ensaio por falta de amostra. No fígado também não foram detectadas variações significativas no conteúdo de proteínas carboniladas após 24 e 168 h de exposição à cafeína (Figura 4).

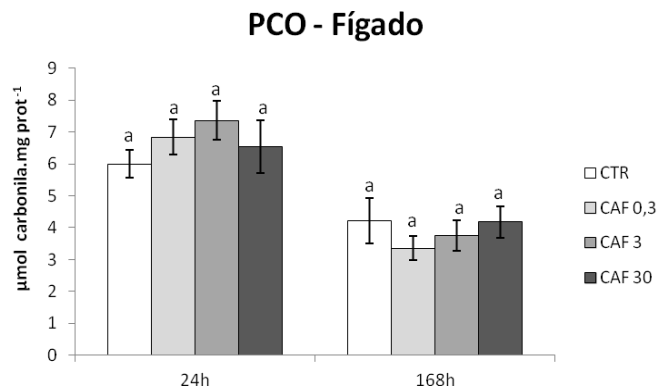


Figura 4: Conteúdo de proteínas carboniladas (PCO) de fígado de *Prochilodus lineatus* após exposição a 0,3; 3 ou 30 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de cafeína (CAF 0,3; CAF 3 e CAF 30, respectivamente) ou somente a água (CTR) por 24 horas e 168 horas ($\bar{x} \pm \text{EP}$; N= 8 a 10). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos para um mesmo tempo de exposição ($P < 0.05$).

3.3 Parâmetros Genotóxicos

Os peixes expostos à cafeína durante 24 e 168 horas não apresentaram aumento de danos no DNA de eritrócitos, em relação aos respectivos controles (Figura 5).

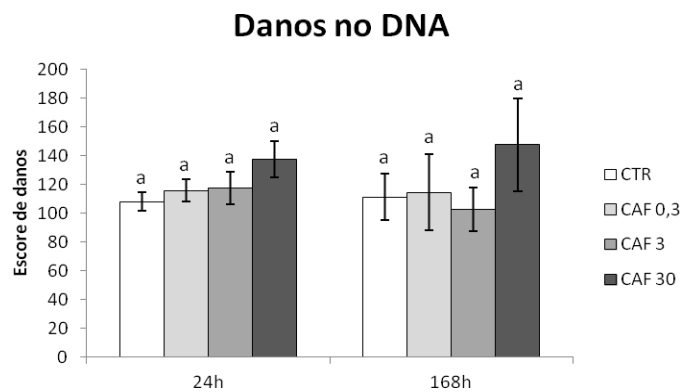


Figura 5: Escore de danos no DNA de eritrócitos de *Prochilodus lineatus* após exposição a 0,3; 3 ou 30 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de cafeína (CAF 0,3; CAF 3 e CAF 30, respectivamente) ou somente a água (CTR) por 24 horas e 168 horas ($\bar{x} \pm \text{EP}$; N= 8 a 10). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos para um mesmo tempo de exposição ($P < 0.05$).

Capítulo II

4. Discussão

Os resultados obtidos no presente trabalho demonstram que a cafeína causa alterações que podem interferir na capacidade de detoxificação de *P. lineatus*, uma vez que ocorreram variações na atividade da EROD, enzima de biotransformação de fase I, além de constatar que essa interferência varia de acordo com o órgão analisado. Este estudo sobre a cafeína é um dos pioneiros em avaliar seus possíveis efeitos em biomarcadores bioquímicos de peixes da região Neotropical. Além de que as concentrações de cafeína utilizadas neste estudo são concentrações que já foram encontradas em rios brasileiros (Montagner et al., 2014; Canela et al., 2014).

Durante os experimentos deste trabalho, as concentrações de cafeína nos aquários se mantiveram constantes, o que era de se esperar, uma vez que a cafeína é um composto relativamente estável em água, com baixa volatilização e meia vida de aproximadamente 10 anos, indicando uma lenta degradação. A estabilidade também se manteve porque já foi visto que a cafeína não demonstra uma correlação entre sua concentração e variações em parâmetros físicos e químicos da água como temperatura, pH ou oxigênio dissolvido (Kurissery et al., 2012; Edwards et al., 2015).

Quanto ao seu comportamento dentro do organismo, em vertebrados, a cafeína é absorvida pelo trato gastrointestinal e é direcionada para o fígado através da corrente sanguínea, onde é metabolizada por enzimas do citocromo P450, principalmente por enzimas da subfamília CYP1A, resultando nos subprodutos paraxantina, teobromina e teofilina (Heckman et al., 2010; Cappelletti et al., 2015). Em peixes, uma forma de se medir a atividade enzimática da CYP1A é por meio da análise da EROD, uma de suas formas catalíticas, considerada uma das principais enzimas responsáveis pela biotransformação de fase I (Van der Oost et al., 2003). No presente trabalho, a cafeína induziu a atividade da EROD no fígado de *P. lineatus* após 168 h de exposição à maior concentração, indicando um processo de detoxificação contra o xenobiótico. Li e colaboradores (2012) também reportaram que a EROD de *Carassius auratus* foi induzida quando estes peixes foram expostos durante 7 dias às concentrações de 3 a 80 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de cafeína. Para moluscos da espécie *Corbicula flumínea* expostos por 21 dias às concentrações de 15 e 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$, a cafeína também foi capaz de aumentar a atividade da EROD da glândula digestiva, que, assim como o fígado, é um órgão importante para o processo de biotransformação (Aguirre-Martínez, et al., 2015).

Capítulo II

Em contrapartida, no cérebro ocorreu uma diminuição da atividade da EROD nos peixes expostos à maior concentração, quando comparados ao seu respectivo controle. Com exceção de um estudo de Beijer e colaboradores (2010), que também encontraram uma diminuição da EROD em brânquias do peixe *Gasterosteus aculeatus* pela cafeína, não foram encontrados outros relatos de que a cafeína seja capaz de diminuir a atividade dessa enzima. Em mamíferos, as enzimas da família das CYPs são responsáveis, entre outras funções, por regular o nível de neurotransmissores, manter o colesterol e a homeostase do fluxo sanguíneo cerebral (Hedlund et al., 2001). Ao diminuir a atividade da EROD no cérebro de *P. lineatus*, a cafeína poderia estar interferindo na regulação normal das funções citadas acima, mas não é possível afirmar tal situação por não existirem estudos envolvendo organismos aquáticos. Além disso, a atividade da EROD no cérebro revelou-se mais alta que no fígado, fato inesperado já que neste órgão ocorre a maior parte de detoxificação em peixes e por isso esperava-se uma maior concentração e atividade dessa enzima (Van der Oost et al., 2003; Uno et al., 2012). Ortiz-Delgado e colaboradores (2002) relataram que a atividade da CYP1A é muito baixa no cérebro do peixe *Sparus aurata*, mas que esta se encontra em todas as regiões cerebrais (bulbo olfativo, mesencéfalo, diencéfalo e cerebelo). Portanto, a metabolização de compostos endógenos e exógenos no cérebro de *P. lineatus* deve ser investigada, uma vez que a atividade da EROD no cérebro deste peixe tem valores relevantes.

A GST está intimamente ligada à fase II de biotransformação de contaminantes, na qual esta enzima catalisa a conjugação do xenobiótico e/ou produtos da biotransformação da fase I com o tripeptídeo GSH, formando um composto que seja mais facilmente excretado pela célula. Além disso, a GST participa diretamente na defesa contra danos oxidativos em lipídios e DNA (Van der Oost et al., 2003). A literatura mostra que vários organismos aquáticos têm a atividade da GST aumentada frente à contaminação por cafeína (Li et al., 2012; Capolupo et al., 2016; Cruz et al., 2016). Contudo, alterações na atividade da GST não foram observadas neste trabalho, demonstrando que em *P. lineatus*, esta enzima não participa da detoxificação da cafeína ou de seus metabólitos oriundos da primeira fase de biotransformação. Estudos em mamíferos demonstram que os produtos resultantes da biotransformação da cafeína pelas enzimas do citocromo P450 (famílias CYP1, CYP2 e CYP3) podem participar de novas reações mediadas

Capítulo II

pelas próprias enzimas do citocromo P450 ou sofrer acetilação pela N-acetiltransferase e hidroxilação pela xantina oxidase (Sawynok e Yaksh, 1993; Burdan, 2015), indicando que a GST não seria a única via de biotransformação de fase II nestes organismos.

O conteúdo de GSH de *P. lineatus* expostos à cafeína também não apresentou alterações significativas. A GSH é um tripeptídeo importante nos processos antioxidantes celulares e, como já citado antes, participa da biotransformação de fase II atuando como substrato para a ação da GST. Esta manutenção dos níveis de GSH reforçam os resultados de que esta via de metabolização não está sendo utilizada e portanto, a cafeína deve ser metabolizada por alguma outra via. Entretanto, níveis de GSH diminuídos já foram encontrados em poliquetos expostos à cafeína, acompanhados por indícios de estresse oxidativo (Pires et al., 2016). As propriedades antioxidantes da GSH abrangem sua atuação como co-fator para outras enzimas (como a GPx) ou sua reação direta com espécies reativas de oxigênio (Hermes-Lima, 2004), ou seja, a diminuição da quantidade de GSH é um agravante para o estabelecimento de um estado de estresse oxidativo.

De acordo com Lushchak (2016), o estresse oxidativo é definido como um aumento nos níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO), perturbando o núcleo celular e vias de sinalização, levando a modificações oxidativas de constituintes celulares que podem culminar em morte celular via necrose ou apoptose. Este excesso de ERO pode ser proveniente do metabolismo normal da célula ou devido à presença de um xenobiótico. A cafeína não foi capaz de causar danos oxidativos em lipídios e proteínas dos tecidos hepático e cerebral e também não ocasionou danos no DNA de eritrócitos. Porém, estudos com moluscos (*Ruditapes philippinarum*) expostos à cafeína durante 28 dias mostraram que este composto é capaz de causar danos em lipídios e diminuir o conteúdo de GSH (Cruz et al., 2016). Em contrapartida, Capolupo e colaboradores (2016) não encontraram diferenças nos níveis de peroxidação lipídica no bivalve *Mytilus galloprovincialis*. Em *P. lineatus*, apesar de a cafeína ter estimulado a biotransformação de fase I no fígado, a quantidade de ERO produzida neste processo não foi o suficiente para estabelecer um estado de estresse oxidativo e ativar os mecanismos antioxidantes do organismo, fato este confirmado pela manutenção dos níveis de GSH e da atividade da GST.

Capítulo II

A genotoxicidade da cafeína já foi relatada por Selby e Sancar (1990) que descreveram que a mesma é capaz de se intercalar na molécula de DNA de bactérias ocasionando o bloqueio de enzimas de reparo. Também, danos no DNA ocasionados pela cafeína podem ocorrer de modo indireto, devido ao estresse oxidativo que esta substância pode acarretar, como já demonstrado por Aguirre-Martínez e colaboradores (2015) que encontraram danos no DNA de hemócitos de *Corbicula fluminea* (mexilhão) após exposição de 21 dias em cafeína. No presente trabalho, a cafeína não causou danos no DNA dos eritrócitos de *P. lineatus*, uma vez que não foi encontrado nenhum aumento no escore de danos pelo ensaio do cometa. Além disso, não foram observados efeitos antioxidantes da cafeína para o DNA de *P. lineatus*, já que esta propriedade da cafeína é mais relatada para mamíferos (George et al, 1999; Azam et al, 2003), apesar de que Aguirre-Martínez e colaboradores (2016) já observaram uma diminuição nos danos de DNA de glândula digestiva de *Ruditapes philippinarum* após exposição de 14 dias em $50 \mu\text{g.L}^{-1}$ de cafeína.

Além dos resultados já discutidos, alguns biomarcadores no cérebro, como EROD e LPO, devem ser destacados por estarem maior nos peixes da exposição de 168 h, em relação ao grupo de 24 h. Por ser o órgão responsável pela regulação da homeostase do organismo, o cérebro demonstrou ser mais sensível que o fígado a uma condição de jejum e confinamento a qual os peixes da exposição de 168 h foram expostos, resultando em algumas respostas que podem interferir na metabolização de compostos endógenos, principalmente hormônios (Bonga, 2011). Entretanto, como já citado anteriormente, as concentrações mais altas de cafeína interferiram nesse processo de metabolização, uma vez que a atividade da EROD cerebral diminuiu em relação ao controle.

Diante dos resultados apresentados neste trabalho, pode-se concluir que a cafeína estimula a fase I de biotransformação no fígado de *P. lineatus*, porém este processo não ocorre no cérebro, onde foi observada uma diminuição da EROD. Por atuar de maneiras diferentes nestes dois órgãos, seria conveniente ampliar esta investigação sobre a detoxificação de cafeína por *P. lineatus* para outros órgãos como rim (relacionado à detoxificação de fármacos) e brânquias (órgão de maior contato com o ambiente contaminado), contribuindo assim para o entendimento da ação da cafeína em peixes. Também foi constatado que mesmo induzindo o processo de biotransformação no fígado, esta condição não foi o suficiente para

Capítulo II

desencadear danos oxidativos em lipídios, proteínas e DNA dos peixes expostos, demonstrando que as defesas antioxidantes de *P. lineatus* são eficientes para proteger o organismo do animal. Entretanto, isto não descarta a necessidade de serem tomadas medidas para a regulamentação do descarte e tratamento de cafeína em ambientes aquáticos, uma vez que o cérebro, um dos principais órgãos alvo da cafeína, sofreu efeitos negativos por este composto.

Referências Bibliográficas

- Aguirre-Martínez, G.V., DelValls, A.T., Martín-Díaz, M.L., 2015. Yes, caffeine, ibuprofen, carbamazepine, novobiocin and tamoxifen have an effect on *Corbicula fluminea* (Müller, 1774). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 120, 142–154.
- Aguirre-Martínez, G.V., DelValls, A.T., Martín-Díaz, M.L., 2016. General stress, detoxification pathways, neurotoxicity and genotoxicity evaluated in *Ruditapes philippinarum* exposed to human pharmaceuticals. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 124, 18-31.
- Arnaud, M.J., 1993. Metabolism of caffeine and other components of coffee. In: Garattini, S. **Caffeine, coffee and health**. Raven Press: New York, 43-95.
- Azam, S., Haidi, N., Khan, N.U., Hadi, S.M., 2003. Antioxidant and prooxidant properties of caffeine, theobromine and xanthine. *Medical Science Monitor*, 9 (9), 325-330.
- Banerjee, P., Ali, Z., Levine, B., Fowler, D.R., 2014. Fatal caffeine intoxication: a series of eight cases from 1999 to 2009. **Journal of Forensic Science**, 59 (3), 865-868.
- Bang, S.H., Ahn, J.Y., Hong, N.H., Sekhon, S.S., Kim, Y.H., Min, J., 2015. Acute and chronic toxicity assessment and the gene expression of *Dhb*, *Vtg*, *Arnt*, *CYP4*, and *CYP314* in *Daphnia magna* exposed to pharmaceuticals. **Molecular Cell Toxicology**, 11, 153-160.
- Beijer, K., Abrahamson, A., Brunström, B., Brandt, I., 2010. CYP1A inhibition in fish gill filaments: A novel assay applied on pharmaceuticals and other chemicals, **Aquatic Toxicology**, 96, 145–150.
- Beutler, E., Durom, O., Kelly, B.M., 1963. Improved method for the determination of blood glutathione. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, 61, 882-890.

Capítulo II

- Bonga, S.E.W., 2011. Hormonal responses to stress. In: Farrel, A.P. **Encyclopedia of fish physiology: from genome to environmental**. Elsevier: London, 1515-1523.
- Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, 72, 248-254.
- Burdan, F., 2015. Pharmacology of Caffeine: The Main Active Compound of Coffee. In: Preddy, V., **Coffee in health and disease prevention**, cap. 90, Elsevier: London, 823-829.
- Campanha, M.B., Awan, A.T., Sousa, D.N.R., Grosseli, G.M., Mozeto, A.A., Fadini, P.S.A., 2015. 3-year study on occurrence of emerging contaminants in an urban stream of São Paulo State of Southeast Brazil. **Environmental Science Pollutant Research**, 22, 7936–7947.
- Canela, M.C., Jardim, W.F., Sodr e, F.F., Grassi, M.T., 2014. **Cafeína em águas de abastecimento público no Brasil/ Instituto Nacional de Ciências e Tecnologias Anal ticas Avan adas-INCTAA**. São Carlos: Editora Cubo, 96 p.: il.
- Capolupo, M., Valbonesi, P., Kiwana, A., Buratti, S., Franzellitti, S., Fabbri, E., 2016. Use of an integrated biomarker-based strategy to evaluate physiological stress responses induced by environmental concentrations of caffeine in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*, **Science of the Total Environment**, 563–564, 538–548.
- Cappelletti, S., Daria, P., Sani, G., Aromatario, M., 2015. Caffeine: cognitive and physical performance enhancer or psychoactive drug? **Current Neuropharmacology**, 13, 71-88.
- Cazenave, J., Bacchetta, C., Parma, M.J., Scarabotti, P.A., Wunderlin, D.A., 2009. Multiple biomarkers responses in *Prochilodus lineatus* allowed assessing changes in the water quality of Salado River basin (Santa Fe, Argentina). **Environmental Pollution**, 157, 3025–3033.
- Colin, N., Porte, C., Fernandes, D., Barata, C., Padr s, F., Carrass n, M., Monroy, M., Cano-Rocabayera, O., Sostoa, A., Piña, B., Maceda-Veiga, A., 2016. Ecological relevance of biomarkers in monitoring studies of macro-invertebrates and fish in Mediterranean rivers. **Science of the Total Environment**, 540, 307–323.

Capítulo II

- Cruz, D., Almeida, A., Calisto, V., Esteves, V.I., Schneider, R.J., Wrona, F.J., Soares, A.M.V.M., Figueira, E., Freitas, R., 2016. Caffeine impacts in the clam *Ruditapes philippinarum*: Alterations on energy reserves, metabolic activity and oxidative stress biomarkers. **Chemosphere**, 160, 95-103.
- Edwards, Q.A., Kulikov, S.M., Garner-O'Neale, L.D., 2015. Caffeine in surface and wastewaters in Barbados, West Indies. **Springer Plus**, 4, 1-12.
- Eggens, M.L., Galgani, F., Klungøyr, J., Everts, J., 1992. Hepatic EROD activity in dab, *Limanda limanda*, in the German Bight using an improved plate-reader method. **Marine Ecology Progress Series**, 91, 71-75.
- Federici, G., Shaw, B.J., Handy, R.D., 2007. Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. **Aquatic Toxicology**, 84, 415–430.
- George, K.C., Hebbler, S.A., Kale, S.P., 1999. Caffeine protects mice against whole-body lethal dose of gamma irradiation. *Journal of Radiological Protection*, 1992, 171-176.
- Gomez, D.A.M., Baca, S., Walsh, E.J., 2015. Lethal and sublethal effects of selected PPCPS on the freshwater rotifer, *Platyonus patulus*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 34 (4), 913–922.
- Heckman, M.A., Weil, J., Demejia, E.G., 2010. Caffeine (1, 3, 7-trimethylxanthine) in foods: a comprehensive review on consumption, functionality, safety, and regulatory matters. **Journal of Food Science**, 75 (3), 77-87.
- Hedlund, E., Gustafsson, J.A., Warner, M., 2001. Cytochrome P450 in the brain: a review. **Current Drug Metabolism**, 2, 245-263.
- Keen, J.H., Habig, W.H., Jakobi, W.B., 1976. Mechanism for the several activities of the glutathione-S-transferases. **Journal of Biological Chemistry**, 251, 6183-6188.
- Kobayashi, H., Sugiyama, C., Morikawa, Y., Hayashi, M., Sofuni, T.A., 1995. Comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis. **MMS Communications**, 3, 103-115.
- Kurissery, S., Kanavillil, N., Verenitch, S., Mazumder, A., 2012. Caffeine as an anthropogenic marker of domestic waste: A study from Lake Simcoe watershed. **Ecological Indice**, 23, 501–508.

Capítulo II

- Lam, P.K.S., 2009. Use of biomarkers in environmental monitoring. **Ocean & Coastal Management**, v. 52, p. 348–354.
- Lesser, M.P., 2012. Oxidative stress in tropical marine ecosystems. In: Abele, D., Vasquez-Medina, J. P., Zenteno-Savín, T. **Oxidative Stress in Aquatic Ecosystems**. Wiley: Blackwell, cap 1, 9–19.
- Levine, R.L., Williams, J.A., Stadtman, E.P., Shacter, E., 1994. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. **Methods Enzymology**, 233, 346–357.
- Li, Z., Lu, G., Yang, X., Wang, C., 2012. Single and combined effects of selected pharmaceuticals at sublethal concentrations on multiple biomarkers in *Carassius auratus*. **Ecotoxicology**, 21, 353-361.
- Lushchak, V.I., 2016. Contaminant-induced oxidative stress in fish: a mechanistic approach. **Fish Physiology Biochemical**, 42 (2), 711-747.
- Montagner, C.C., Jardim, W.F., Von Der Ohe, P.C., Umbuzeiro, G.A., 2014. Occurrence and potential risk of triclosan in freshwaters of São Paulo, Brazil—the need for regulatory actions. **Environmental Science Pollution Research**. 21, 1850–1858.
- Ortiz-Delgado, J.B., Sarasquete, C., Behrens, A., Canales, M.L.G., Segner, H., 2002. Expression, cellular distribution and induction of cytochrome P4501A (CYP1A) in gilthead seabream, *Sparus aurata*, brain. **Aquatic Toxicology**, 60, 269-283.
- Palermo, F., Risso, W.E., Simonato, J.D., Martinez, C.B.R., 2015. Bioaccumulation of nickel and its biochemical and genotoxic effects on juveniles of the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 116, 19–28.
- Petrovic, M., Gonzalez, S., Barcelo, D., 2003. Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water. **Trends in Analytical Chemistry**, 22 (10), 685-696.
- Pires, A., Almeida, A., Calisto, V., Schneider, R.J., Esteves, V.I., Wrona, F.J., Soares, A.M.V.M., Figueira, E., Freitas, R., 2016. Long-term exposure of polychaetes to caffeine: Biochemical alterations induced in *Diopatra neapolitana* and *Arenicola marina*. **Environmental Pollution**, 214, 456-463.
- Richendrfer, H., Pelkowski, S.D., Colwill, R.M., Creton, R., 2012. On the edge: pharmacological evidence for anxiety-related behavior in zebrafish larvae. **Behavior Brain Research**, 228 (1), 99-106.

Capítulo II

- Rodriguez, R.S., Haugen, R., Rueber, A., Huang, C.C., 2014. Reversible neuronal and muscular toxicity of caffeine in developing vertebrates. **Comparison Biochemical Physiology and Toxicology Pharmacology**, 163, 47–54.
- Santos, T.G., Martinez, C.B.R., 2012. Atrazine promotes biochemical changes and DNA damage in a Neotropical fish species. **Chemosphere**, 89, 1118–1125.
- Sawynok, J., Yaksh, T.L., 1993. Caffeine as an analgesic adjuvant: a review of pharmacology and mechanisms of action. **Pharmacological Reviews**, 45 (1), 45-85.
- Selby, C.P., Sancar, A., 1990. Molecular mechanisms of DNA repair inhibition by caffeine. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America**, 87, 3522-3525.
- 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 Pollution**, 206, 57–67.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice R.R., Schneider E.L., 1988. A single technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, 175, 184-191.
- Stuart, M.; Lapworth, D.; Crane, E.; Hart, A., 2012. Review of risk from potential emerging contaminants in UK groundwater. **Science of the Total Environment**, v. 416, p. 1 – 21.
- Uno, T., Ishizuka, M., Itakura, T., 2012. Cytochrome P450 (CYP) in fish. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 34, 1-13.
- USEPA. United States Environmental Protection Agency. Contaminants of Emerging Concern including Pharmaceuticals and Personal Care Products. Disponível em: <http://www.epa.gov>. acesso em: abril/2016.
- Van Der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 13, 57-149.
- Vanzella, T.P., Martinez, C.B.R., Cólus, I.M.S., 2007. Genotoxic and mutagenic effects of diesel oil water soluble fraction on a neotropical fish species. **Mutation Research**, 631, 36-43.

CAPÍTULO III**A interferência da cafeína no transporte iônico em brânquias de
*Prochilodus lineatus***

Manuscrito a ser submetido para publicação no periódico **Fish Physiology and Biochemistry**.

Capítulo III

A interferência da cafeína no transporte iônico em brânquias de *Prochilodus lineatus*

Thais Graciano Santos Silva*, Cláudia Bueno dos Reis Martinez*

Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Estadual de Londrina, 86051-990, Londrina, Paraná, Brasil.

*autor para correspondência: thaisgsantos8@hotmail.com.

RESUMO

A cafeína é uma substância pertencente ao grupo dos contaminantes emergentes e que tem se destacado por ser frequentemente encontrada em ecossistemas aquáticos. Seus efeitos para humanos são bastante conhecidos, porém ainda são poucos os estudos sobre os efeitos da cafeína na fisiologia de peixes. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi investigar se a cafeína promove alterações em parâmetros associados à osmorregulação do peixe de água doce *Prochilodus lineatus*. Para tanto, peixes jovens foram expostos à cafeína nas concentrações (em $\mu\text{g.L}^{-1}$) de 0,3 (CAF 0,3), 3 (CAF 3) e 30 (CAF 30) ou somente à água (CTR) durante 24 e 168 h. Foram analisadas as concentrações plasmáticas dos íons sódio, potássio, cálcio e magnésio e a atividade branquial das enzimas Na^+/K^+ -ATPase (NKA), H^+ -ATPase (HA), Ca^{2+} -ATPase (CaA), Mg^{2+} -ATPase (MgA) e anidrase carbônica (AC). Os peixes do grupo CAF 30 tiveram alterações nas concentrações plasmáticas dos íons magnésio em 24 horas e do sódio e cálcio em 168 horas, quando comparados aos seus respectivos controles. Não foram observadas alterações nas atividades da anidrase carbônica, NKA e HA, porém a MgA e CaA apresentaram uma diminuição em suas atividades nos peixes do grupo CAF 30 após 24 h e 168 h de exposição, respectivamente. Sendo assim, a cafeína está afetando diretamente no transporte de íons na brânquia de *P. lineatus* com consequente alteração na concentração plasmática dos mesmos, tanto em 24 h quanto em 168 h de exposição.

Palavras-chave: ATPases, cálcio, contaminante emergente, íons plasmáticos, osmorregulação.

Capítulo III

1. Introdução

A poluição aquática por contaminantes emergentes vem crescendo nas últimas décadas e acabou se tornando uma questão ambiental de dimensões mundiais (Birkholz et al., 2014). É considerado contaminante emergente, ou também chamado de micropoluente, qualquer substância que ainda não está regulamentada por leis ambientais, mas que, frequentemente, é encontrada em ecossistemas aquáticos e, em sua maioria, são desconhecidos seus efeitos para a biota aquática (Luo et al., 2014; Campanha et al., 2015). Esta classe de contaminantes inclui produtos farmacêuticos e de higiene pessoal, drogas ilícitas, nanomateriais, genes de resistência a antibióticos, hormônios, surfactantes, aditivos industriais e retardadores de chama, os quais são encontrados nos ecossistemas em concentrações na ordem de $\mu\text{g.L}^{-1}$ e ng.L^{-1} (Noguera-Oviedo e Aga, 2016).

A cafeína é um contaminante emergente que vem se destacando por ser encontrado frequentemente em amostras de águas superficiais (Canela et al., 2014; Montagner et al., 2014a; Campanha et al., 2015). Estes altos índices de contaminação aquática por cafeína podem estar associados ao seu alto consumo, tanto em bebidas e alimentos (chocolates, chás, refrigerantes e café), quanto associada a outros fármacos (analgésicos, principalmente), pois, cerca de 5% da cafeína consumida não é metabolizada e é excretada pela urina, além de que, muitas vezes, alimentos contendo cafeína são descartados sem serem consumidos (Banerjee et al, 2014; Montagner et al., 2014b).

O principal efeito da cafeína é a estimulação do sistema nervoso central através de mecanismos relacionados ao bloqueio de receptores de adenosina, alterando o estado de alerta, a sensação de fadiga e a circulação sanguínea. A cafeína também pode atuar inibindo a fosfodiesterase, promovendo um aumento na lipólise devido à diminuição da degradação do AMP cíclico. Outro efeito amplamente conhecido da cafeína é a mobilização de cálcio em células musculares, promovendo um aumento da contração muscular ocasionada pela interferência nas ATPases dependentes de cálcio do retículo sarcoplasmático (Sawynok e Yaksh, 1993; Cappelletti et al., 2015).

Apesar de os efeitos da cafeína sobre o íon cálcio em células de mamíferos serem bastante documentados (Gubareff e Sleator, 1965, Endo, 1975, Heaney, 2002, Mathew et al., 2014), estudos sobre a interferência deste composto no transporte de íons pelas brânquias de animais aquáticos ainda são desconhecidos.

Capítulo III

Por serem organismos que estão susceptíveis a variações iônicas no ambiente em que vivem, a necessidade desses animais em manter os níveis osmóticos e iônicos equilibrados faz com que a avaliação da atividade de enzimas responsáveis pela regulação iônica celular e equilíbrio ácido-base seja um excelente exemplo de biomarcador para a verificação de compostos que influenciem nestes processos (Evans et al., 2005).

Teleósteos dulcícolas são hiperosmóticos em relação ao ambiente, por isso, seus mecanismos fisiológicos para osmorregulação precisam ser extremamente eficientes, uma vez que esses animais enfrentam a constante perda de íons para o meio através de difusão e o excessivo ganho de água por osmose (Becker e Baldisserotto, 2014). Consequentemente, as brânquias e o rim desses peixes possuem especializações capazes de absorver ativamente íons do ambiente e eliminar o excesso de água. Enzimas presentes nas membranas das células branquiais atuam na captação de diversos íons, principalmente sódio, cloreto e cálcio. Já o rim é provido de inúmeros glomérulos que aumentam a capacidade de filtração do sangue e os túbulos proximal e distal possuem uma alta capacidade de reabsorção de íons (Hwang, 2011, Becker e Baldisserotto, 2014). Além disso, o transporte de íons através das brânquias pode gerar alterações no equilíbrio ácido-base, uma vez que os dois processos ocorrem nas mesmas células e envolvem mecanismos intimamente relacionados (expulsão de H^+ e HCO_3^- e captação de Na^+ e Cl^- , respectivamente) (Hwang, 2011).

A espécie neotropical *Prochilodus lineatus* é bastante utilizada em estudos que investigam os efeitos de contaminantes nos processos osmorregulatórios e do balanço ácido-base de peixes, por ser um animal de fisiologia conhecida e sensível a diversos tipos de poluentes (Camargo et al., 2009; Simonato et al., 2013; Ribeiro et al., 2014, Silva e Martinez, 2014). Entretanto, até o momento, ainda não se tem relatos de estudos que contemplem os efeitos de contaminantes emergentes na osmorregulação deste peixe, e de outros teleósteos dulcícolas neotropicais. Portanto, devem-se ampliar as pesquisas sobre as consequências da presença de poluentes emergentes para os mecanismos de osmorregulação e equilíbrio ácido-base da biota aquática, uma vez que são processos fundamentais para a homeostase desses organismos.

Uma vez que a cafeína é um micropolvente de relevância para águas doces superficiais e que possui efeitos conhecidos na mobilização do cálcio em células

Capítulo III

musculares de mamíferos, pode-se presumir que este composto possa ter algum efeito no transporte iônico de brânquias de peixes dulcícolas. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da cafeína na osmorregulação de *Prochilodus lineatus* após 24 e 168 horas de exposição.

2. Material e métodos

Este estudo teve a aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (Processo CEUA nº 19618.2013.57).

2.1 Aclimação

Juvenis de *Prochilodus lineatus* (peso (g)= $15,04 \pm 0,8$; comprimento padrão (cm)= $9,2 \pm 0,2$; n= 80), provenientes da Piscicultura Aqua Norte (Cambará-PR), foram mantidos durante sete dias em tanques de 300 L contendo água limpa, desclorada e com aeração constante. Durante este período, foi fornecida ração comercial a cada 48 horas e a alimentação foi cessada 24 horas antes da montagem dos experimentos. O monitoramento dos parâmetros físicos e químicos da água ocorreu durante toda a aclimação e exposição ($t = 22,78 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,065$; $\text{pH} = 8,19 \pm 0,015$; O.D. = $8,16 \text{ mg.O}_2\text{.L}^{-1} \pm 0,128$; condutividade = $0,116 \text{ mS.cm}^{-1} \pm 0,002$).

2.2 Experimentos e Amostragem

Aquários de 80L foram previamente preparados com uma solução estoque de cafeína (Synth 99%) dissolvida em água ultra pura, obtendo-se as concentrações finais de 0,3; 3 e 30 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de cafeína. Os aquários controles receberam apenas água desclorada e limpa. Os peixes já aclimatados foram separados em grupos de 10 indivíduos e colocados em cada um dos aquários, onde ficaram expostos durante 24 e 168 horas. A cada 24 horas foi feita a renovação total da água de todos os aquários e, sempre antes de colocar os peixes (t0h) e após a retirada dos mesmos (t24h), amostras de água eram coletadas e mantidas em refrigeração (10°C) para posterior análise das concentrações de íons.

Terminados os tempos de exposição, os peixes foram anestesiados em benzocaína ($0,1\text{g.L}^{-1}$) para a retirada de sangue pela veia caudal através de seringas previamente heparinizadas e mortos por secção medular para a coleta das brânquias, que foram armazenadas em ultrafreezer (-80°C) para análises futuras.

Capítulo III

2.3 Determinação da Concentração de Íons no Plasma e na Água

O sangue retirado foi centrifugado (1870 g, 15 min) e o plasma separado e mantido a -20°C. As análises dos íons sódio e potássio foram feitas em fotômetro de chamas com amostras de plasma diluído em água deionizada (1:100). Os íons cálcio e magnésio foram analisados em espectrofotômetro de absorção atômica com amostras de plasma diluídas em óxido de lantânio (1:40). Para a determinação da concentração dos íons na água, as alíquotas coletadas a cada renovação foram analisadas da mesma forma que as amostras de plasma, mas sem as respectivas diluições. As concentrações dos íons foram expressas em mM.

2.4 Determinação da Atividade das ATPases

Os filamentos branquiais separados dos arcos foram homogeneizados em tampão SEID (150 mM Sacarose, 10 mM EDTA, 50 mM Imidazol, 2,4 mM Desoxicolato sódico, pH 7,5) e centrifugados (15 min, 7500 g, 4°C). O sobrenadante foi utilizado para mensurar a atividade da Na⁺/K⁺-ATPase, H⁺-ATPase, Ca²⁺-ATPase e Mg²⁺-ATPase de modo indireto, no qual se mede a produção de fosfato inorgânico proveniente da quebra de ATP durante um intervalo de 30 minutos. Para os ensaios da Na⁺/K⁺-ATPase e H⁺-ATPase, as amostras foram incubadas em tampão comum às duas enzimas (30 mM Imidazol, 45 mM NaCl, 15 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 0,4 mM KCN, 1 mM ATP, 0,2 mM NADH, 3 U/mL PK, 2 U/mL LDH, 0,1 mM Frutose, 2 mM PEP) e para mensurar a atividade individual foram acrescentados inibidores: Ouabaína (2 mM) para a NKA e NEM (2 mM) para a HA (Gibbs e Somero, 1989). Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol ADP} \cdot \text{mg prote\u00edna}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Para os ensaios da Ca²⁺-ATPase e Mg²⁺-ATPase foi seguido o protocolo de Vijayavel e colaboradores (2007), com modificações, no qual as amostras se mantiveram em um tampão de incubação (189 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 20 mM Tris, 2 mM Ouabaína, 3 mM ATP), com o acréscimo de diferentes sais para estimar separadamente a atividade da CaA (5 mM CaCl₂) e da MgA (14 mM KCl, 0,2 mM EDTA). Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol Pi} \cdot \text{mg prot}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$.

2.5 Determinação da Atividade da Anidrase Carbônica

A determinação da atividade da anidrase carbônica (AC) foi realizada com base no protocolo de Vitale et al. (1999), que consiste em analisar a catálise de uma solução saturada de CO₂ com correspondente liberação de H⁺, e consequente

Capítulo III

redução do pH. Para tanto, os filamentos branquiais foram homogeneizados em solução tampão (225 mM manitol, 75 mM sacarose, 10 mM Tris-base e 10 mM NaH_2PO_4 , pH 7.4) e centrifugados (10 min, 13.600 g, 4°C) e o sobrenadante foi adicionado a uma solução de água saturada de CO_2 , na qual a redução do pH foi monitorada por um tempo de 20 s. A atividade da AC foi expressa $\text{AC.mg proteína}^{-1}$.

2.6 Determinação da Concentração de Proteínas Totais

Para expressar a atividade enzimática das ATPases e da anidrase carbônica foi feita a medida da concentração de proteínas totais das amostras de brânquias através do método de Bradford (1976), baseada em uma curva padrão de albumina de soro bovino (BSA), em espectrofotômetro a 595 nm.

2.7 Análises Estatísticas

Para cada parâmetro, foi feita a comparação entre os grupos experimentais (CTR, CAF 0,3; CAF 3 e CAF 30), para um mesmo tempo, por meio de análise de variância paramétrica (ANOVA) ou não-paramétrica (Kruskall-Wallis), de acordo com a distribuição dos dados (normalidade e homogeneidade de variância), e as diferenças entre os grupos localizadas pelos testes Student-Newman-Keuls e Dunn's (respectivamente), sendo considerado para ambos os casos $P < 0,05$.

3. Resultados

3.1 Concentração Plasmática de Íons

A concentração de sódio no plasma dos peixes do grupo CAF 3, em 24 horas, aumentou significativamente quando comparado ao CTR. Já em 168 horas, o grupo CAF 30 apresentou um aumento significativo em relação ao CTR. Para a concentração plasmática do íon potássio não houve diferença significativa entre os grupos. Os peixes do grupo CAF 30 apresentaram uma diminuição na concentração do cálcio plasmático em 168 horas em relação ao seu respectivo CTR. Já o magnésio teve sua concentração aumentada no plasma dos peixes do tratamento CAF 30 quando comparado ao CTR no experimento de 24 horas (Figura 1).

Capítulo III

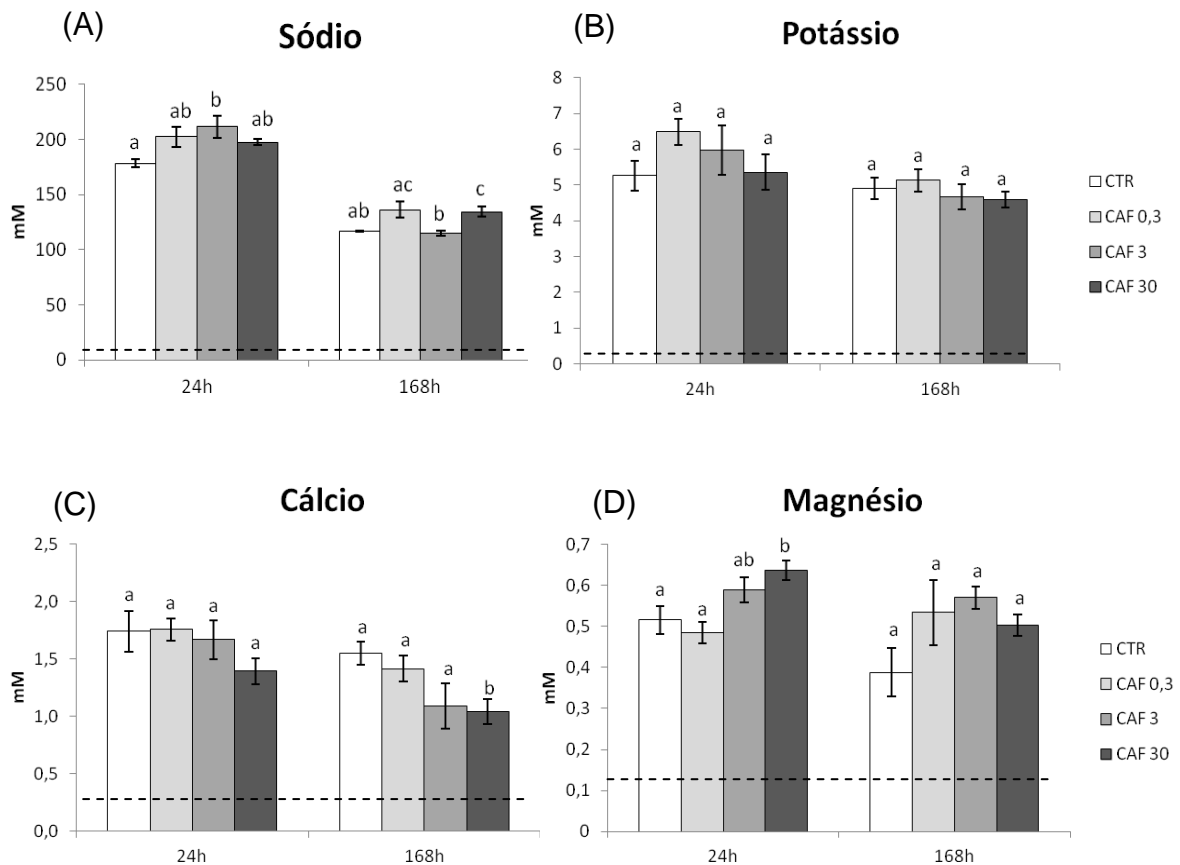


Figura 1: Concentrações plasmáticas dos íons sódio (A), potássio (B), cálcio (C) e magnésio (D) em *Prochilodus lineatus* após exposição a 0,3; 3 ou 30 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de cafeína (CAF 0,3; CAF 3 e CAF 30, respectivamente) ou somente a água (CTR) por 24 h e 168 h ($\bar{x} \pm \text{EP}$; N= 8 a 10). As linhas tracejadas representam as concentrações médias dos íons na água. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos para um mesmo tempo de exposição ($P < 0.05$).

3.2 Atividade das ATPases

Os peixes expostos à cafeína não apresentaram alterações nas atividades das enzimas Na^+/K^+ -ATPase (Figura 2A) e H^+ -ATPase (Figura 2B) em nenhum dos tempos experimentais. Porém, a Ca^{2+} -ATPase (Figura 2C) teve sua atividade diminuída nos peixes do grupo CAF 30 expostos durante 168 horas à cafeína e, em 24 horas, houve uma tendência de diminuição ($p = 0,050$). Já a Mg^{2+} -ATPase apresentou diminuição em sua atividade nos peixes do grupo CAF 30 da exposição de 24 horas (Figura 2D).

Capítulo III

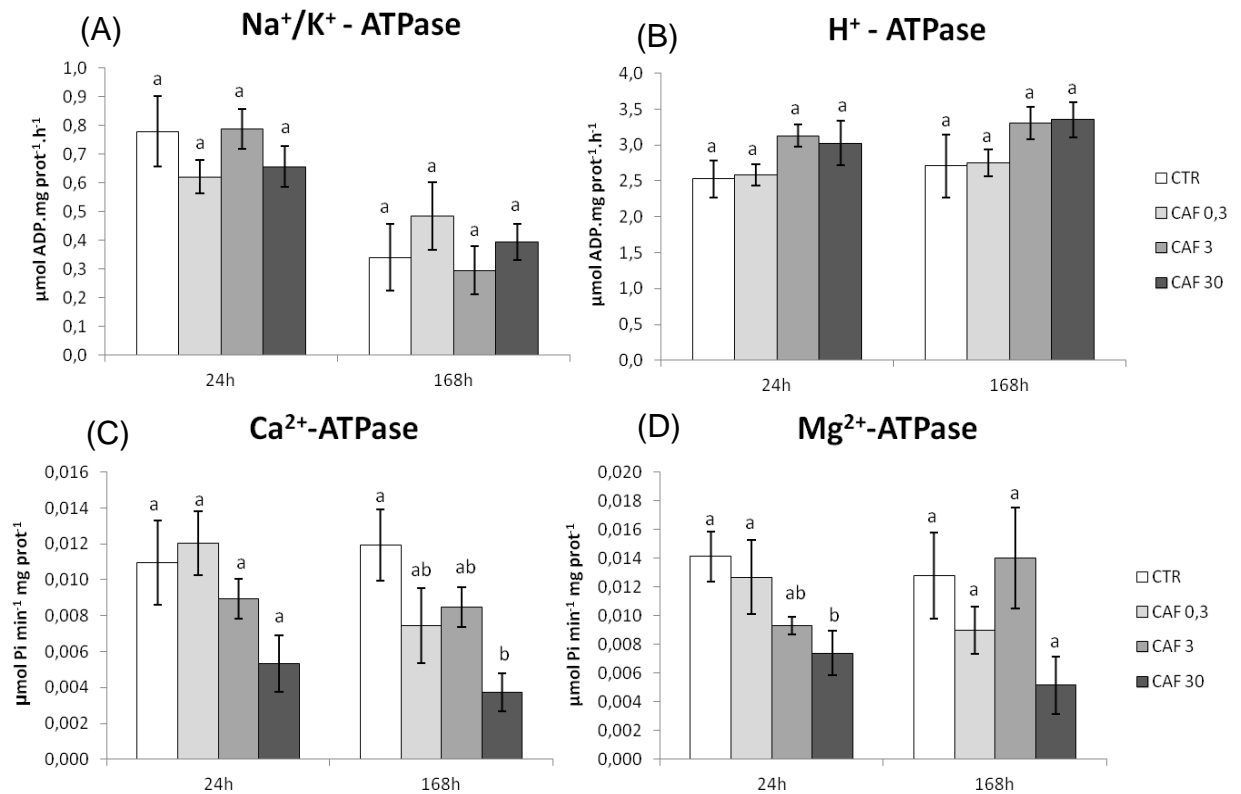


Figura 2: Atividade da Na⁺/K⁺-ATPase (A), H⁺-ATPase (B), Ca²⁺-ATPase (C) e Mg²⁺-ATPase (D) em *Prochilodus lineatus* após exposição a 0,3; 3 ou 30 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ de cafeína ou (CAF 0,3; CAF 3 e CAF 30, respectivamente) ou somente a água (CTR) por 24 h e 168 h ($\bar{x} \pm \text{EP}$; N= 8 a 10). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos para um mesmo tempo de exposição (P < 0.05).

3.4 Atividade da Anidrase Carbônica

A atividade da anidrase carbônica de brânquias de *P. lineatus* expostos à cafeína não se demonstrou alterada em nenhum dos tempos experimentais (Figura 3).

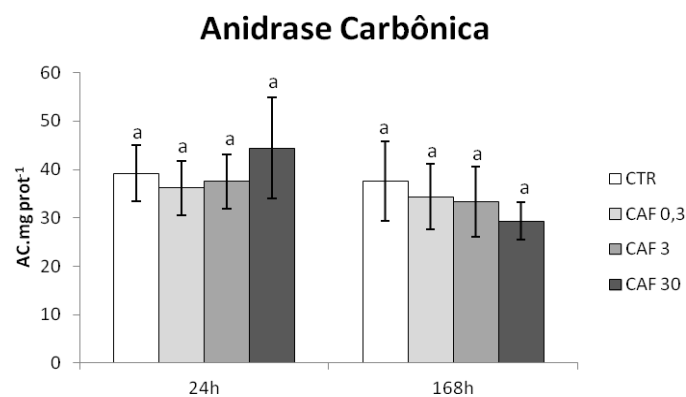


Figura 3: Atividade da Anidrase Carbônica em brânquias de *Prochilodus lineatus* após exposição a 0,3; 3 ou 30 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ de cafeína ou (CAF 0,3; CAF 3 e CAF 30, respectivamente) ou somente a água (CTR) por 24 horas e 168 horas ($\bar{x} \pm \text{EP}$; N= 8 a 10). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos para um mesmo tempo de exposição (P < 0.05).

Capítulo III

4. Discussão

A cafeína demonstrou ser uma substância que pode influenciar na homeostase de *P. lineatus*, uma vez que ocorreram variações na atividade de enzimas relacionadas ao transporte iônico, além de interferir na concentração plasmática dos íons sódio, cálcio e magnésio. As concentrações de cafeína utilizadas neste trabalho são próximas a concentrações encontradas em estudos referentes a águas superficiais brasileiras (Montagner et al., 2014a; Canela et al., 2014), o que destaca a importância de pesquisas sobre este composto. Ao mesmo tempo, são poucos estudos que englobam espécies nativas da região Neotropical, ressaltando ainda mais a relevância deste trabalho.

Sabe-se que a presença de contaminantes no ambiente aquático pode interferir diretamente no balanço osmótico de um organismo, podendo alterar as concentrações iônicas plasmáticas devido a alterações em enzimas transportadoras de íons, bem como na competição com canais iônicos (Evans et al., 2005; Camargo et al., 2009; Silva e Martinez, 2014). Para *P. lineatus*, a cafeína não foi capaz de alterar as concentrações plasmáticas do íon potássio (K^+), bem como não foram observadas alterações na atividade da NKA, corroborando tais resultados, uma vez que o K^+ apresenta altas concentrações no interior celular e seu balanço nas brânquias ocorre principalmente pela ação da NKA e canais de K^+ localizados na membrana basolateral da célula (Hwang e Lin, 2014). Apesar de a cafeína não ter alterado o funcionamento desta enzima, a atividade da NKA em *P. lineatus* já se demonstrou sensível a diversos outros contaminantes, como por exemplo o alumínio (Camargo et al., 2009), a gasolina (Simonato et al., 2013), o cádmio (Silva e Martinez, 2014) e o chumbo (Ribeiro et al., 2014), o que deve ser levado em consideração ao se escolher um biomarcador para a investigação dos efeitos de contaminantes para a osmorregulação desta espécie.

A concentração plasmática de Na^+ apresentou aumento em 24 horas nos peixes expostos à concentração intermediária ($3 \mu g.L^{-1}$) e em 168 horas no grupo da maior concentração ($30 \mu g.L^{-1}$) de cafeína. A captação de Na^+ em células ricas em mitocôndrias (CRM) de brânquias de teleosteos dulcícolas está intimamente relacionada com a HA, a qual expulsa os íons H^+ , provenientes da dissociação do $H_2CO_3^-$ pela AC, para o ambiente externo (Hwang e Lin, 2014). Quando expostos a outros contaminantes, principalmente metais, as atividades destas enzimas no peixe *P. lineatus* demonstraram-se bastante sensíveis, havendo alterações mesmo em 24

Capítulo III

horas (Simonato et al., 2013; Ribeiro, 2014; Silva e Martinez, 2014). Porém, a cafeína não ocasionou mudanças nas atividades da HA e da AC, o que se pode concluir que não seriam estes os mecanismos que estariam atuando nas mudanças dos níveis de Na^+ no plasma.

Outra enzima responsável pela manutenção dos níveis plasmáticos de Na^+ é a NKA, localizada na membrana basolateral das CRM das brânquias, que atua expulsando o Na^+ para o meio extracelular e captando K^+ para o meio intracelular (Hwang e Lin, 2014). Contudo, como já citado anteriormente, não foram observadas alterações nos níveis de K^+ e a NKA não apresentou mudanças em sua atividade, demonstrando, assim, não estar participando das alterações de Na^+ no plasma. Para *P. lineatus*, não é a primeira vez que alterações nos níveis plasmáticos de Na^+ ocorrem devido à presença de um contaminante (Camargo et al., 2009; Simonato et al., 2013; Ribeiro, 2014), porém nestes casos essas alterações foram acompanhadas pelo mau funcionamento da NKA, o que não ocorreu com a cafeína.

Foi observada uma diminuição na atividade da CaA nos peixes do grupo CAF 30 após 168 h de exposição, o que contribui para a diminuição do Ca^{2+} no plasma. Silva e Martinez (2014) também encontraram uma diminuição na atividade da CaA de *P. lineatus* quando estes foram expostos ao cádmio, demonstrando que esta espécie apresenta uma suscetibilidade nos processos de regulação de Ca^{2+} no organismo frente a uma contaminação. No caso da exposição à cafeína existe um agravante, já que estudos comprovam que esta substância está intimamente ligada com a disponibilização de Ca^{2+} nas células musculares de mamíferos, aumentando o nível do íon no citoplasma, além de dificultar a recaptção pela CaA da membrana do retículo sarcoplasmático (Cappelletti et al., 2015). Portanto, presume-se que a cafeína esteja atuando na atividade da CaA, uma vez que essa enzima na brânquia é responsável pela expulsão do Ca^{2+} do meio intracelular para o meio extracelular e a mesma encontra-se com sua atividade diminuída nos peixes do grupo CAF 30 do experimento de 168 horas, além de que os níveis plasmáticos de Ca^{2+} encontram-se diminuídos nos animais do mesmo grupo. Entretanto, como foi observada uma diminuição dos níveis plasmáticos de cálcio (Ca^{2+}), sugere-se que o trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ possa estar sofrendo alguma interferência da cafeína (ou metabólitos) e, por isso, os níveis desses dois íons estejam alterados, uma vez que este trocador é responsável por retirar o Na^+ do plasma e enviar para o meio intracelular enquanto que o Ca^{2+} faz o caminho inverso.

Capítulo III

A absorção do íon Mg^{2+} pelo organismo do peixe ocorre principalmente pelo trato gastrointestinal, sendo que a brânquia pode contribuir em até 16% do total de Mg^{2+} captado da água doce, contudo este mecanismo ainda não está bem definido (Flik et al., 1993; Bijvelds et al., 1998). Em *P. lineatus* ocorreu um aumento da concentração plasmática do Mg^{2+} após 24 horas de exposição à maior concentração de cafeína. Entretanto, como houve uma diminuição da atividade branquial da MgA, de alguma forma esta enzima está impedindo a captação de Mg^{2+} pela célula indicando que esta enzima tem um papel decisivo no transporte do Mg^{2+} para dentro da célula.

Portanto, a cafeína está afetando diretamente a função de transporte iônico na brânquia de *P. lineatus* tanto em 24 horas quanto em 168 horas de exposição, uma vez que ocasionou alterações em enzimas relacionadas ao balanço iônico e ocorreram mudanças nas concentrações plasmáticas de determinados íons. Apesar de, aparentemente, o equilíbrio ácido-base não ter sofrido com estes efeitos, essas mudanças fisiológicas são cruciais para a homeostase do animal, já que este processo de captação e expulsão de íons é fundamental para peixes de ambientes dulcícolas. Ainda que os efeitos da cafeína na captação de cálcio em células musculares de mamíferos já estejam bem descritos, é de extrema importância entender como esse composto pode afetar na osmorregulação de animais aquáticos, fazendo com que este trabalho contribua para o entendimento deste processo.

Referências Bibliográficas

- Banerjee, P., Ali, Z., Levine, B., Fowler, D.R., 2014. Fatal caffeine intoxication: a series of eight cases from 1999 to 2009. **Journal of Forensic Science**, 59 (3), 865-868.
- Becker, A.G., Baldisserotto, B., 2014. Regulação osmótica e iônica. In: Baldisserotto, B., Cyrino, J.E.P., Urbinati, E.C. **Biologia e fisiologia de peixes neotropicais de água doce**. 1ª Ed., Funesp: Jaboticabal, 253-264.
- Bijvelds, M.J.C., Van der Velden, J.A., Kolar, Z.I., Flik, G., 1998. Magnesium transport in freshwater teleosts. **The Journal of Experimental Biology**, 201, 1981-1990.

Capítulo III

- Birkholz, D.A., Stilson, S.M., Elliott, H.S., 2014. Analysis of emerging contaminants in drinking water – a review. In: Ahuja, S. **Comprehensive Water Quality and Purification**. Elsevier: Waltham, pp. 212–229.
- Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, 72, 248-254.
- Camargo, M.P.M., Fernandes, M.N., Martinez, C.B.R., 2009. How aluminium exposure promotes osmoregulatory disturbances in the neotropical freshwater fish *Prochilus lineatus*. **Aquatic Toxicology**, 94, 40–46.
- Campanha, M.B., Awan, A.T., Sousa, D.N.R., Grosseli, G.M., Mozeto, A.A., Fadini, P.S.A., 2015. 3-year study on occurrence of emerging contaminants in an urban stream of São Paulo State of Southeast Brazil. **Environmental Science Pollutant Research**, 22, 7936–7947.
- Canela, M.C., Jardim, W.F., Sodr , F.F., Grassi, M.T., 2014. **Cafeína em águas de abastecimento público no Brasil/ Instituto Nacional de Ciências e Tecnologias Anal ticas Avan adas-INCTAA**. São Carlos: Editora Cubo, 96 p.: il.
- Cappelletti, S., Daria, P., Sani, G., Aromatario, M., 2015. Caffeine: cognitive and physical performance enhancer or psychoactive drug? **Current Neuropharmacology**, 13, 71-88.
- Edwards, Q.A., Kulikov, S.M., Garner-O’Neale, L.D., 2015. Caffeine in surface and wastewaters in Barbados, West Indies. **Springer Plus**, 4, 1-12.
- Endo, M., 1975. Mechanism of action of caffeine on the sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle. *Proceedings of the Japan Academy*, 51 (6), 479-484.
- Evans, D.H., Piermarini, P.M., Choe, K.P., 2005. The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. **Physiology Review**, 85, 97-177.
- Evans, D.H., 2011. Osmoregulation in fish: an introduction. In: Farrel, A.P. **Encyclopedia of fish physiology: from genome to environmental**. Elsevier: London, 1348-1353.
- Flik, G., Velden, J.A.V.D., Dechering, K.J., Verbost, P.M., Schoenmakers, T.J.M., Kolar, Z.I., Bonga, S.E.W., 1993. Ca²⁺ and Mg²⁺ transport in gills and gut of tilapia, *Oreochromis mossambicus*: a review. **The Journal of Experimental Zoology**, 265, 356-365.

Capítulo III

- Gibbs, A., Somero, G.N., 1989. Pressure adaptation of Na⁺/K⁺-ATPase in gills of marine teleosts. **Journal of Experimental Biology**, 143, 475–492.
- Gubareff, T., Sleator, W., 1965. Effects of caffeine on mammalian atrial muscle and its interaction with adenosine and calcium. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 148 (2), 202-214.
- Heaney, R.P., 2002. Effects of caffeine on bone and the calcium economy. **Food and Chemical Toxicology**, 40, 1263–1270.
- Hwang, P.P., 2011. Mechanisms of ion transport in freshwater fishes. In: Farrel, A.P. **Encyclopedia of fish physiology: from genome to environmental**. Elsevier: London, 1359-1365.
- Hwang, P.P., Lin, L.Y., 2014. Gill ionic transport, acid-base regulation, and nitrogen excretion. In: Evans, D.H., Clairbone, J.B., Currie, S. **The physiology of fishes**. 4^a ed., CRC Press: Boca Raton, 206-233.
- Kurissery, S., Kanavillil, N., Verenitch, S., Mazumder, A., 2012. Caffeine as an anthropogenic marker of domestic waste: A study from Lake Simcoe watershed. **Ecological Indice**, 23, 501–508.
- Luo, Y., Guo, W., Ngo, H.H., Nghiem, L.D., Hai, F.I., Zhang, J., Liang, S., Wang, X.C., 2014. A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. **Science of the Total Environment**, 473, 619–641.
- Mathew, T.S., Ferris, R.K., Downs, R.M., Kinsey, S.T., Baumgarner, B.L., 2014. Caffeine promotes autophagy in skeletal muscle cells by increasing the calcium-dependent activation of AMP-activated protein kinase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 453 (3), 411-418.
- Montagner, C.C., Jardim, W.F., Von Der Ohe, P.C., Umbuzeiro, G.A., 2014. Occurrence and potential risk of triclosan in freshwaters of São Paulo, Brazil—the need for regulatory actions. **Environmental Science Pollution Research**. 21, 1850–1858.
- Montagner, C.C., Vidal, C., Sodré, F.F., Pescara, I.C., Jardim, W.F., 2014. A cafeína no ambiente. In: Canela, M.C., Jardim, W.F., Sodré, F.F., Grassi, M.T. **Cafeína em águas de abastecimento público no Brasil/ Instituto Nacional de Ciências e Tecnologias Analíticas Avançadas-INCTAA**. São Carlos: Editora Cubo, 12-23.

Capítulo III

- Noguera-Oviedo, K., Aga, D.S., 2016. Lessons learned from more than two decades of research on emerging contaminants in the environment. **Journal of Hazardous Materials**, 316, 242–251.
- Ribeiro, A.M., 2014. Acúmulo tecidual, resposta de estresse e perfil osmorregulatório de *Prochilodus lineatus* nas primeiras 24 horas de exposição ao chumbo. 126 p. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.
- Ribeiro, A.M., Risso, W.E., Fernandes, M.N., Martinez, C.B.R., 2014. Lead accumulation and its effects on the branchial physiology of *Prochilodus lineatus*. **Fish Physiology Biochemical**, 40, 645-657.
- Sawynok, J., Yaksh, T.L., 1993. Caffeine as an analgesic adjuvant: a review of pharmacology and mechanisms of action. **Pharmacological Reviews**, 45 (1), 45-85.
- Silva, A.O.F., Martinez, C.B.R., 2014. Acute effects of cadmium on osmoregulation of the freshwater teleost *Prochilodus lineatus*: Enzymes activity and plasma ions. **Aquatic Toxicology**, 156, 161–168.
- Simonato, J.D., Fernandes, M.N., Martinez, C.B.R., 2013. Physiological effects of gasoline on the freshwater fish *Prochilodus lineatus* (Characiformes: Prochilodontidae). **Neotropical Ichthyology**, 11(3), 683-691.
- Vijayavel, K., Gopalakrishnan, S., Balasubramanian M.P., 2007. Sublethal effect of silver and chromium in the green mussel *Perna viridis* with reference to alterations in oxygen uptake, filtration rate and membrane bound ATPase system as biomarkers. **Chemosphere**, 69, 979–986.
- Vitale, A.M., Monserrat, J.M., Castilho, P., Rodriguez, E.M., 1999. Inhibitory effects of cadmium on carbonic anhydrase activity and ionic regulation of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Grapsidae). **Comparative Biochemistry Physiology, part C**, 122, 121-129.

CAPÍTULO IV**Alterações comportamentais em *Prochilodus lineatus* após
exposição à cafeína**

Manuscrito a ser submetido para publicação para o periódico **Comparative Biochemistry and Physiology. C. Toxicology & Pharmacology.**

Capítulo IV

Alterações comportamentais em *Prochilodus lineatus* após exposição à cafeína

Thais Graciano Santos Silva*, Paulo César Meletti, Cláudia Bueno dos Reis Martinez
Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Estadual de Londrina, 86051-990, Londrina, Paraná, Brasil.

*autor para correspondência: thaisgsantos8@hotmail.com.

RESUMO

A presença de cafeína em ecossistemas aquáticos gera uma preocupação de como este composto pode interagir com a biota local. Conhecida por seus efeitos estimulantes, estudos vêm demonstrando os efeitos da cafeína no comportamento de peixes e em biomarcadores fisiológicos. No presente trabalho, juvenis de *Prochilodus lineatus* foram submetidos a testes comportamentais e análise de biomarcadores bioquímicos após exposição à cafeína nas concentrações de 0,3 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (CAF 0,3), 3 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (CAF 3) e 30 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (CAF 30), ou somente à água (CTR) durante 24 h e 168 h. Após 24 h, os peixes expostos à cafeína apresentaram aumento na resistência natatória, embora na concentração intermediária tenha sido observada diminuição na velocidade de natação espontânea. Em 168 h, não houve alterações comportamentais entre os tratamentos. Também, em 168 h, os peixes expostos à cafeína apresentaram valores do fator de condição menores seus respectivos grupos do experimento de 24 h, além de ocorrer uma diminuição na atividade da acetilcolinesterase (AChE) no músculo dos peixes expostos à maior concentração. Sendo assim, a cafeína demonstrou afetar o comportamento de natação de *P. lineatus*, porém esta interferência parece não estar relacionada com a atividade da AChE muscular, e sim com os efeitos da cafeína em outros mecanismos neurobiológicos.

Palavras-chave: acetilcolinesterase, fator de condição, natação espontânea, resistência natatória, teste claro-escuro.

Capítulo IV

1. Introdução

A cafeína (1,3,7-trimetilxantina) é uma substância alcaloide encontrada em sementes, folhas e frutos de mais de 60 plantas, incluindo cacau (*Theobroma cacao*), erva-mate (*Ilex paraguariensis*) e guaraná (*Paullinia cupana*), mas é a partir dos grãos de café (*Coffea arabica* e *C. robusta*) que provém a principal fonte de cafeína no mundo (Heckman et al., 2010). Este composto é conhecido por seus efeitos estimulantes no sistema nervoso central, mas também pode estar associado a medicamentos para resfriados, alergias e analgésicos (Sawynok e Yaksh, 1993; Montagner et al., 2014). De acordo com Heckman et al. (2010), a cafeína pode ter como efeitos no organismo o aumento do desempenho físico e da concentração, a diminuição do estado de fadiga e a perda de peso. Estes efeitos podem ocorrer devido a ações da substância ao nível celular, como a competição com os receptores de adenosina, a inibição da atividade das fosfodiesterases, o bloqueio dos receptores de GABA (ácido γ -aminobutírico) e a alteração do fluxo de cálcio intracelular das células musculares (Sawynok e Yaksh, 1993; Burdan, 2015; Cappelletti et al., 2015).

Por apresentar muitos benefícios à saúde humana, a cafeína se destaca como um dos psicoativos mais consumidos mundialmente. Entretanto, esta substância também vem se revelando como um dos principais contaminantes de ambientes aquáticos, devido as suas características físico-químicas e facilidade de entrada nos corpos hídricos através do esgoto doméstico (Montagner et al., 2014; Edwards et al., 2015). Estudos apontam a cafeína como um dos principais contaminantes emergentes da atualidade, pois, além de ser frequentemente detectada em amostras de água, ainda não existe regulamentação para as concentrações máximas permitidas desse composto nos ecossistemas aquáticos (Matamoros et al., 2012; Canela et al., 2014).

A partir do momento em que a cafeína alcança um ambiente hídrico, pode haver uma interação com a biota local, por isso se faz necessário uma avaliação dos possíveis efeitos da cafeína para estes organismos. Para animais aquáticos os trabalhos com cafeína abordam principalmente biomarcadores neurológicos e comportamentais por seus principais efeitos estarem relacionados ao sistema nervoso (Li et al., 2012; Richendrfer et al., 2012; Rodriguez et al., 2014; Ladu et al., 2015). Assim, é de extrema importância a investigação de tais parâmetros, uma vez que perturbações nos mecanismos dos neurotransmissores decorrentes da

Capítulo IV

contaminação por cafeína pode afetar o comportamento do animal, trazendo prejuízos não só para o indivíduo, mas para a população como um todo (Scott e Sloman, 2004; Colin et al., 2016).

Diferentes ensaios podem ser aplicados para avaliar as alterações comportamentais que a cafeína, ou qualquer outra substância, pode exercer em um organismo. O teste de preferência por claro ou escuro foi descrito para peixes a primeira vez em 1999 (Serra et al., 1999), e pode ser utilizado para entender o comportamento de ansiedade provocado por algum xenobiótico (Maximino et al., 2010; Simonato et al., 2016). O padrão de natação também serve como ferramenta na análise do comportamento de peixes, podendo ser mensurado através da resistência natatória, exploração da coluna d'água, natação errática, comportamento de congelamento e comportamento de agrupamento dos indivíduos (Egan et al., 2009; Ladu et al., 2015, Simonato et al., 2016).

Associar testes comportamentais à biomarcadores bioquímicos e fisiológicos relacionados ao comportamento pode auxiliar na compreensão de como o contaminante está agindo em um organismo (Scott e Sloman, 2004). A acetilcolinesterase é uma enzima que pode ser utilizada como biomarcador, uma vez que é responsável pela hidrólise do neurotransmissor acetilcolina em colina e ácido acético, evitando assim a ação contínua da acetilcolina e mantendo o funcionamento normal dos sistemas sensorial e neuromuscular (Van der Oost et al., 2003; Sarkar et al., 2006). A concentração de glicose no plasma dos peixes é um biomarcador que contribui para a detecção de um estado de estresse consequente da presença de um contaminante ou até mesmo após a manipulação do animal (Van der Oost et al., 2003; Bonga, 2011). Além disso, a glicose plasmática pode ser um indicativo do estado de nutrição do peixe, dado importante ao se fazer um ensaio de comportamento.

O fator de condição é uma medida bastante empregada na avaliação do estado de saúde e bem-estar de peixes. A partir da relação entre o peso e comprimento, é possível estimar o estado de energia desses animais (Chellappa et al., 1995). Uma vez que a cafeína possui uma relação com a diminuição de peso em humanos, deve-se levar em consideração o fator de condição quando se tratar de ensaios que utilizem peixes como modelo experimental. O peixe *Prochilodus lineatus* é uma espécie que tem sua fisiologia bastante estudada, cujo fator de condição é bastante estável, existindo pouca variação entre indivíduos de populações diferentes

Capítulo IV

(Rocha et al., 1997). Além disso, *P. lineatus* também se destaca como uma excelente espécie para ensaios ecotoxicológicos, uma vez que se apresenta bastante sensível a diferentes contaminantes e responde satisfatoriamente a testes comportamentais (Simonato et al., 2016).

Levando-se em consideração a frequência da contaminação de ambientes aquáticos por cafeína e a importância de se investigar seus efeitos em organismos aquáticos, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da cafeína no comportamento e em alguns biomarcadores bioquímicos e fisiológicos de *P. lineatus* após exposição de 24 e 168 horas.

2. Material e métodos

Este trabalho teve aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (Processo CEUA nº 19618.2013.57).

2.1 Aclimação e Montagem dos Experimentos

Durante sete dias, juvenis de *Prochilodus lineatus* (peso (g)= $15,26 \pm 1,1$; comprimento padrão (cm)= $9,28 \pm 0,2$; n= 80), fornecidos pela Piscicultura Aqua Norte (Cambará-PR), foram mantidos em tanques de 300 L com água limpa, desclorada e aeração constante. A alimentação com ração comercial ocorreu a cada 48 horas, sendo interrompida com 24 horas de antecedência à montagem dos experimentos. Os parâmetros químicos e físicos da água foram monitorados durante a aclimação e experimentos (T: $22,78 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,065$; pH: $8,19 \pm 0,015$; OD: $8,16 \text{ mg.O}_2\text{.L}^{-1} \pm 0,128$; condutividade: $0,116 \text{ mS.cm}^{-1} \pm 0,002$).

Em seguida à aclimação, grupos de 10 peixes foram colocados em aquários de 80 L e expostos durante 24 e 168 horas às seguintes condições: somente água desclorada (grupo controle – CTR) e a concentrações de 0,3, 3 e 30 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de cafeína (grupos CAF 0,3, CAF 3 e CAF 30, respectivamente). As concentrações de cafeína foram escolhidas a partir de trabalhos que relataram concentrações semelhantes em ambientes aquáticos naturais (Sodré et al., 2010; Montagner et al., 2014; Campanha et al., 2015).

2.2 Testes Comportamentais

Após os tempos experimentais, os peixes foram submetidos individualmente aos testes comportamentais. Para os testes de claro-escuro e atividade natatória

Capítulo IV

espontânea, os aquários permaneceram em uma câmara que os isolavam do ambiente externo e que dispunha de um sistema de monitoramento (Geovision) por câmeras de vídeo para análises posteriores. O teste de resistência natatória foi monitorado e cronometrado no momento do ensaio, não necessitando de filmagem.

2.2.1 Teste de preferência claro x escuro

Os animais foram colocados em um aquário de dimensões 14 x 74 x 35 cm (largura x comprimento x altura), com a linha d'água em 25 cm (26 L), dividido em duas partes revestidas com filme adesivo, uma branca e outra preta. Os peixes foram aclimatados ao sistema em um compartimento central (15 x 15 x 25 cm) delimitado por divisórias móveis acionadas remotamente. Após 5 minutos de aclimação o compartimento foi aberto e o registro iniciado (Geovision) para posterior contagem do tempo de permanência na parte clara ou escura durante 10 minutos.

2.2.2 Teste de atividade natatória espontânea

Para estes testes, os peixes foram colocados em outro aquário também com volume aproximado de 26 L, mas de dimensões 14 x 43 x 50 (largura x comprimento x altura), com a linha d'água em 43 cm. Foram realizadas filmagens (Geovision) de 15 minutos, dos quais os primeiros 5 minutos foram de adaptação e os 10 minutos restantes utilizados para a análise da atividade natatória. Com o auxílio do software SACAM (Jorge, 2005) foram calculados o tempo de movimento, a distância percorrida e a velocidade de natação do animal durante os 10 minutos. O software também possibilitou a divisão virtual da coluna d'água em três estratos, de modo que foi possível determinar a preferência de ocupação pelos peixes. Este último parâmetro, embora tenha sido gerado durante o teste de natação espontânea, será apresentado e discutido também no âmbito da ansiólise/ansiogênese, em conjunto com o teste de preferência claro-escuro.

2.2.3 Teste de resistência natatória

Para este teste foi utilizado um sistema constituído por uma bomba e um tubo transparente de 1 metro de comprimento e 50 mm de diâmetro interno, no qual os peixes foram inseridos para natação em contracorrente. Inicialmente o fluxo de água foi mantido em 10 L.min⁻¹, por 1 minuto, como adaptação. Em seguida, a vazão foi

Capítulo IV

gradativamente aumentada em $5 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ a cada um minuto, até a exaustão do animal, quando este ultrapassava a marca de 1 metro no tubo de observação, ou até a vazão máxima de $70 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$. O índice de resistência natatória (IRN) foi calculado a partir da fórmula: $\sum \text{vazões} + (\text{tempo na última vazão}/60 \times \text{valor da última vazão})$.

2.3 Amostragem e Análise de biomarcadores

Depois do último teste comportamental, os peixes foram anestesiados em benzocaína ($0,1\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) para tomada do peso (g), comprimento padrão (cm) e comprimento total (cm). Então, foi retirado o sangue pela veia caudal com o auxílio de seringas previamente heparinizadas e, em seguida, os animais foram mortos por secção medular para a retirada do cérebro e amostra de músculo, os quais foram congelados em ultrafreezer (-80°C) para análises posteriores.

2.3.1 Fator de Condição

O fator de condição de Fulton foi estimado a partir da fórmula: $K=W/L^3$, onde W equivale ao peso total e L representa o comprimento total.

2.3.2 Glicose Plasmática

Após a coleta, o sangue foi centrifugado (1870 g , 15 min) e o plasma separado e mantido a -20°C . A glicose plasmática foi estimada através do método da glicose oxidase (Labtest Diagnóstica, Brasil) em espectrofotômetro de microplacas em 505 nm e apresentado como $\text{mg}\cdot\text{dL}^{-1}$.

2.3.3 Atividade da Acetilcolinesterase (AChE)

A atividade da AChE foi mensurada nas amostras de cérebro e músculo através da quantificação do produto da reação da acetilcolina com o DTNB (Alves Costa et al., 2007), em 415 nm e expressa em $\text{nmol de DTNB}\cdot\text{minuto}^{-1}\cdot\text{mg de proteína}^{-1}$. Para medir a concentração total de proteínas das amostras foi utilizado o método de Bradford (1976), o qual se estima o conteúdo total de proteínas a partir de uma curva padrão de albumina de soro bovino (BSA), em espectrofotômetro a 595 nm .

2.4 Análises Estatísticas

Capítulo IV

A comparação entre os tratamentos (CTR; CAF 0,3; CAF 3 e CAF 30) de um mesmo tempo experimental foi realizada por meio de análise de variância paramétrica (ANOVA) ou não-paramétrica (Kruskall-Wallis), de acordo com a distribuição dos dados (normalidade e homogeneidade de variância), e os testes Student-Newman-Keuls e Dunn's (respectivamente) foram empregados para localização de diferenças entre os tratamentos. Para a verificação de diferenças de um mesmo tratamento entre os dois tempos experimentais diferentes (24 h x 168 h) foi aplicado teste t de student ou Mann-Whitney. Para todos os casos, foram considerados significativos valores de $P < 0,05$.

3. Resultados

3.1 Testes Comportamentais

3.1.1 Atividade natatória espontânea

Os peixes expostos à cafeína em 24 horas e 168 horas não apresentaram diferença significativa no tempo de natação quando comparados aos seus respectivos CTR. Entretanto, os animais do grupo CTR de 168 horas demonstraram uma diminuição no tempo de natação quando comparados aos peixes CTR do experimento de 24 horas (Figura 1A). Em relação à distância de natação, nenhum grupo de peixes apresentou diferenças neste comportamento em ambos os experimentos, em cada tempo experimental. Porém, novamente, os peixes do grupo CTR de 168 horas apresentaram uma diminuição na distância percorrida ao serem comparados ao grupo CTR de 24 horas (Figura 1B). Já no parâmetro de velocidade de natação, os animais de CAF 3 do teste de 24 horas apresentaram uma diminuição quando comparado ao seu CTR. Nos animais do experimento de 168 horas não foram observadas diferenças significativas (Figura 1C).

Capítulo IV

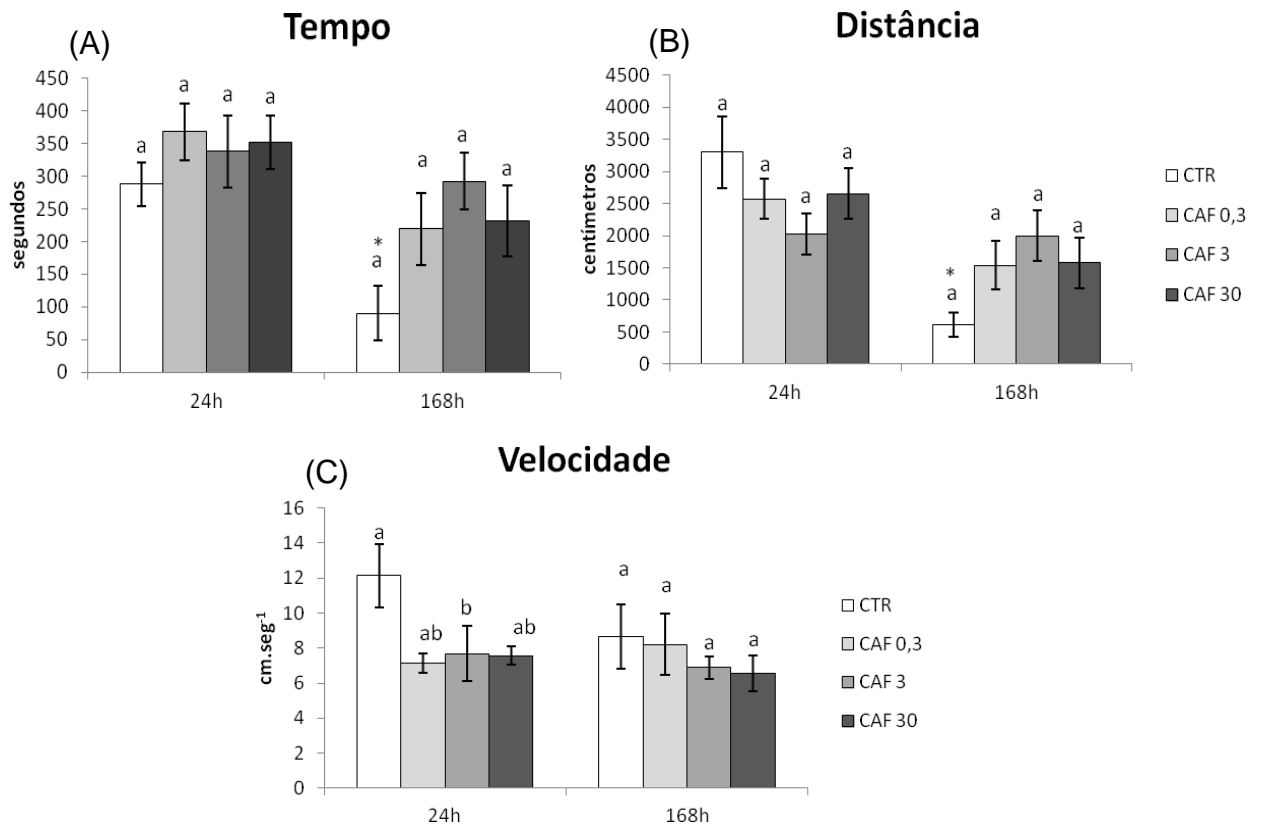


Figura 1: Tempo (A), distância (B) e velocidade de natação (C) de *Prochilodus lineatus* após exposição a 0,3; 3 ou 30 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de cafeína (CAF 0,3; CAF 3 e CAF 30, respectivamente) ou somente à água (CTR) por 24 horas e 168 horas ($\bar{x} \pm \text{EP}$; N= 8 a 10). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos do mesmo tempo experimental e * significa diferença de um grupo nos diferentes tempos de exposição (P < 0.05).

3.1.2 Resistência natatória

Os peixes expostos à maior concentração de cafeína durante 24 horas apresentaram um aumento na resistência natatória em relação ao seu respectivo CTR. Em 168 horas não foi observada diferença neste comportamento entre os grupos. Contudo, quando comparados os animais do experimento de 168 horas aos seus respectivos tratamentos da exposição de 24 horas, os mesmos apresentaram uma diminuição significativa em sua resistência natatória (Figura 2).

Capítulo IV

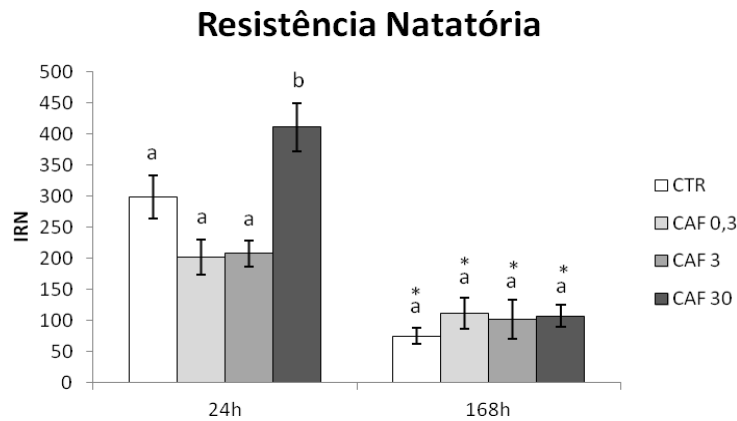


Figura 2: Resistência natatória de *P. lineatus* após exposição a 0,3; 3 ou 30 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de cafeína (CAF 0,3; CAF 3 e CAF 30, respectivamente) ou somente a água (CTR) por 24 horas e 168 horas ($\bar{x} \pm \text{EP}$; N= 8 a 10). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos do mesmo tempo experimental e * significa diferença de um grupo nos diferentes tempos de exposição ($P < 0.05$).

3.1.3 Ocupação espacial e preferência claro x escuro

Em relação à ocupação dos estratos superior, médio e inferior do aquário, foi observado que os peixes de todos os grupos (CTR, CAF 0,3, CAF 3 e CAF 30) dos dois experimentos (24 e 168 horas) permaneceram a maior parte do tempo no estrato inferior (Figura 3). Contudo, em 24 horas, os animais de CAF 30 mantiveram-se por mais tempo no estrato inferior que os demais grupos. Já em 168 horas, os peixes do grupo CTR permaneceram 100% do tempo no estrato inferior enquanto que os peixes dos outros grupos exploraram os demais estratos, mesmo que por pouco tempo. Não foram observadas diferenças na ocupação dos estratos quando comparados animais do mesmo grupo, mas de tempos experimentais diferentes.

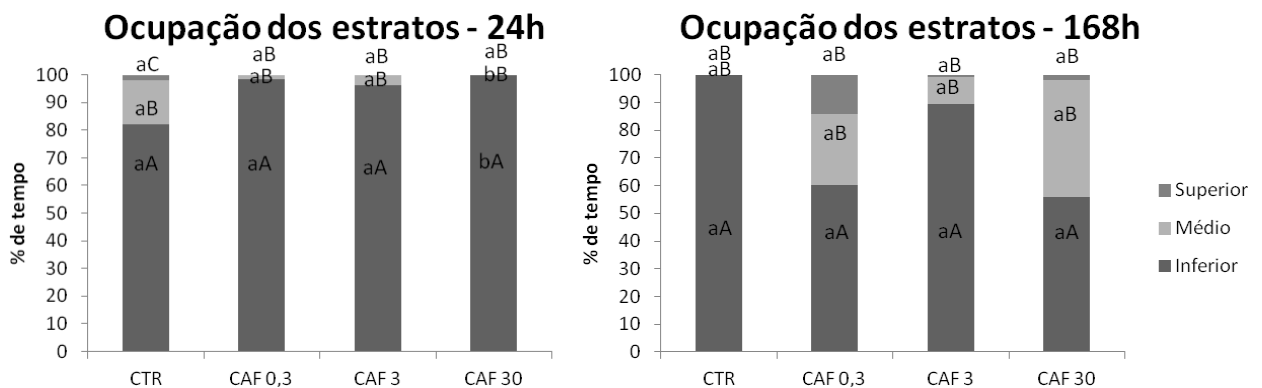


Figura 3: Porcentagem de tempo de ocupação dos estratos inferior, médio e superior de *P. lineatus* após exposição a 0,3; 3 ou 30 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de cafeína (CAF 0,3; CAF 3 e CAF 30, respectivamente) ou somente a água (CTR) por 24 horas e 168 horas ($\bar{x} \pm \text{EP}$; N= 8 a 10). Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa na ocupação de um mesmo estrato entre os tratamentos do mesmo tempo experimental e letras maiúsculas indicam as diferenças entre os estratos em um mesmo grupo ($P < 0.05$).

Capítulo IV

Quanto à preferência ao ambiente claro ou escuro, todos os peixes de todos os tratamentos (CTR, CAF 0,3, CAF 3 e CAF 30) de ambos os tempos experimentais (24 e 168 horas) permaneceram a maior parte do tempo na parte escura do aquário. Não foram observadas diferenças significativas na escolha por claro ou escuro entre os grupos de mesmo tempo de exposição. Também não houve diferenças entre os peixes do mesmo grupo em tempos de exposição diferentes (Figura 4).

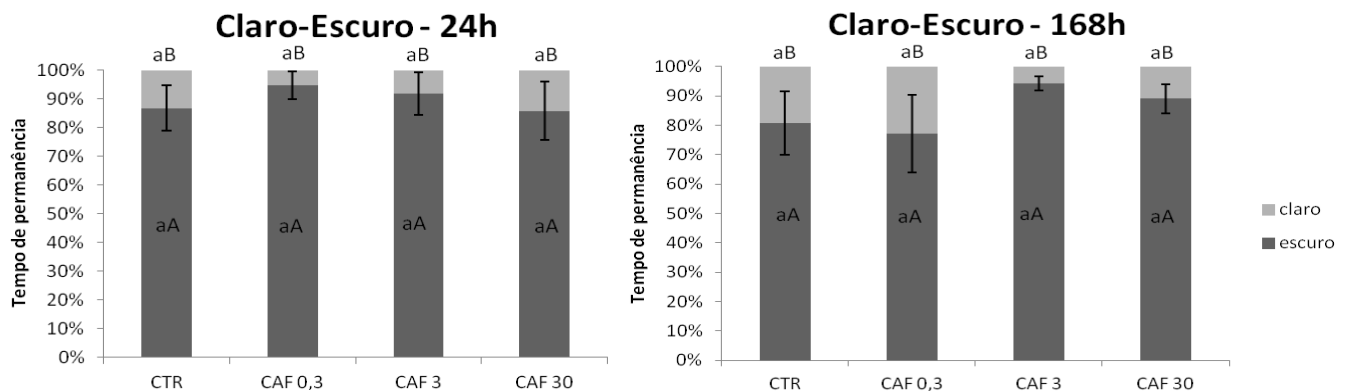


Figura 4: Comportamento de preferência por ambiente claro ou escuro de *Prochilodus lineatus* após exposição a 0,3; 3 ou 30 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de cafeína (CAF 0,3; CAF 3 e CAF 30, respectivamente) ou somente à água (CTR) por 24 horas e 168 horas ($\bar{x} \pm \text{EP}$; N= 8 a 10). Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa da permanência no claro e no escuro entre os grupos do mesmo tempo experimental. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa na preferência por claro ou escuro em um mesmo grupo experimental ($P < 0.05$).

3.2 Fator de Condição

Em ambos os experimentos (24 e 168 horas), os peixes expostos às três concentrações de cafeína não sofreram alterações em seus valores do fator de condição quando comparados aos seus respectivos controles (Figura 5). Contudo, ao ser comparado os mesmos grupos dos tempos experimentais diferentes, a cafeína provocou uma diminuição do fator de condição dos animais que permaneceram durante 168 horas nas concentrações de cafeína e esta diferença não foi observada entre os dois CTR.

Capítulo IV

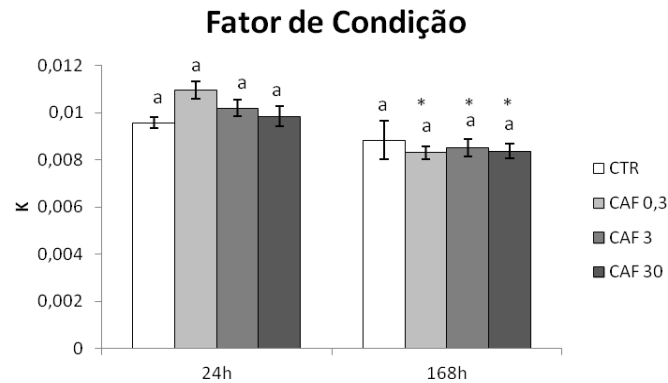


Figura 5: Fator de condição de Fulton em *Prochilodus lineatus* após exposição a 0,3; 3 ou 30 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de cafeína (CAF 0,3; CAF 3 e CAF 30, respectivamente) ou somente a água (CTR) por 24 horas e 168 horas ($\bar{x} \pm \text{EP}$; N= 8 a 10). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos do mesmo tempo experimental e * significa diferença de um grupo nos diferentes tempos de exposição ($P < 0.05$).

3.3 Glicose Plasmática

A concentração de glicose plasmática não apresentou diferença significativa entre os peixes dos diferentes tratamentos em cada experimental (Figura 6). Porém, foi observada uma diminuição significativa da glicose no plasma dos animais do experimento de 168 horas quando comparados aos seus respectivos tratamentos do experimento de 24 horas.

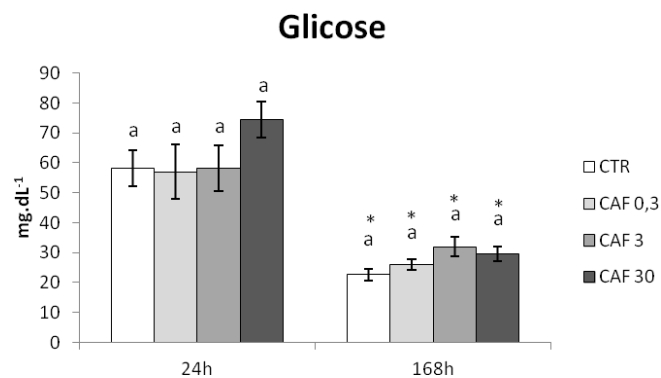


Figura 6: Conteúdo de glicose no plasma de *Prochilodus lineatus* após exposição a 0,3; 3 ou 30 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de cafeína (CAF 0,3; CAF 3 e CAF 30, respectivamente) ou somente a água (CTR) por 24 horas e 168 horas ($\bar{x} \pm \text{EP}$; N= 8 a 10). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos do mesmo tempo experimental e * significa diferença de um grupo nos diferentes tempos de exposição ($P < 0.05$).

3.4 Atividade da Acetilcolinesterase (AChE)

A atividade da acetilcolinesterase no cérebro não apresentou diferença estatisticamente significativa nos peixes de ambos os tempos experimentais. Porém,

Capítulo IV

quando comparado cada grupo nos diferentes tempos de exposição, os animais expostos às três concentrações de cafeína (CAF 0,3; CAF 3 e CAF 30) do experimento de 168 horas apresentaram um aumento na atividade da enzima. No grupo CTR não foi observada esta diferença (Figura 7A). Para a atividade muscular da AChE não foi encontrada diferença entre os grupos do experimento de 24 horas e em 168 horas apenas os peixes do grupo CAF 30 apresentaram uma diminuição na atividade quando comparado ao seu respectivo CTR. Ao ser verificado se houve diferenças em cada grupo nos diferentes tempos experimentais, foi constatado um aumento na atividade da AChE muscular dos animais CTR e CAF 30 (Figura 7B).

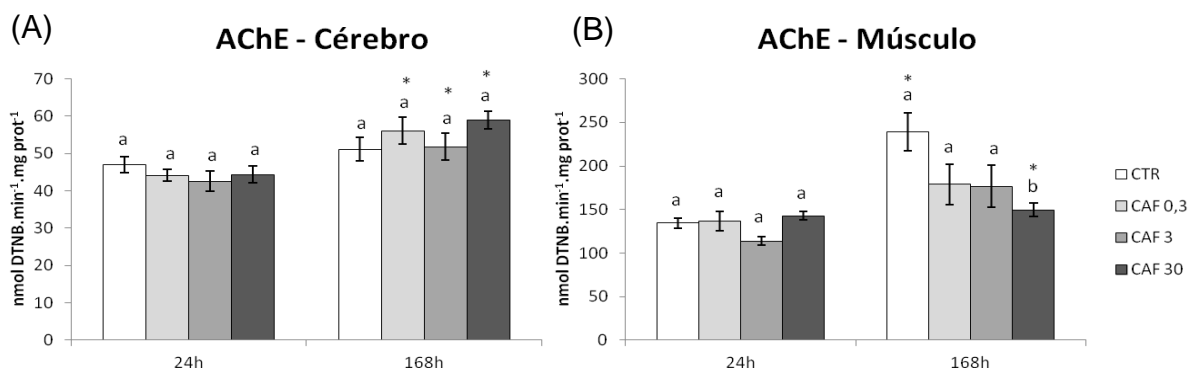


Figura 7: Atividade da acetilcolinesterase (AChE) em cérebro (A) e músculo (B) de *Prochilodus lineatus* após exposição a 0,3; 3 ou 30 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de cafeína (CAF 0,3; CAF 3 e CAF 30, respectivamente) ou somente a água (CTR) por 24 horas e 168 horas ($\bar{x} \pm \text{EP}$; N= 8 a 10). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos do mesmo tempo experimental e * significa diferença de um grupo nos diferentes tempos de exposição ($P < 0.05$).

4. Discussão

No presente trabalho, a cafeína foi capaz de promover alterações no comportamento de natação de *P. lineatus*, além de diminuir a atividade da acetilcolinesterase, enzima importante para o sistema neuromuscular. Sabe-se que o principal modo de ação da cafeína é atuar como antagonista nos receptores de adenosina, um neurotransmissor responsável pela sensação de fadiga (Sawynok e Yaksh, 1993), o que pode estar relacionado aos efeitos estimulantes observados nestes parâmetros. No índice de resistência natatória também puderam ser observados os efeitos estimulantes da cafeína no grupo de maior concentração, porém apenas em 24 horas. Assim, a não ocorrência desses efeitos estimulantes após 168 horas de exposição à cafeína pode ser explicada pelo fato de que os

Capítulo IV

peixes não foram alimentados durante o experimento - o que refletiu na incapacidade de responder ao aumento da demanda energética que ocorre durante a natação contracorrente - e/ou de que a cafeína não esteja mais atuando nos receptores de adenosina, uma vez que, ao longo do tempo, pode ocorrer uma adaptação do organismo ao composto (Svenningsson et al., 1999).

Os animais do experimento de 168 horas apresentaram valores de glicose plasmática aproximadamente 50% menores que aqueles do de 24 horas, o que pode sugerir que os efeitos estimulantes da cafeína não puderam ser detectados pelo teste de resistência natatória no experimento de 168 horas devido à depleção das reservas energéticas ocasionada pelo período prolongado de jejum. Entretanto, ao observar os parâmetros de natação espontânea, tempo de movimento e distância, notou-se que os peixes do grupo controle de 168 h apresentaram uma diminuição em relação ao respectivo grupo do experimento de 24 h, porém a cafeína pareceu amenizar os efeitos do jejum, fazendo com que os animais expostos às três concentrações apresentassem um padrão de natação semelhante nos dois tempos. Em resumo, após 168 horas de jejum, os animais expostos à cafeína podem ter energia e estímulo apenas para se movimentar constantemente em natação espontânea, mas não para desempenhar uma atividade muscular mais intensa, como é exigido no teste de resistência natatória.

Em natação espontânea, mesmo com a diminuição da glicemia, os animais podem ter se utilizado de lipídios, pois se sabe que a cafeína é capaz de estimular a lipólise através da inibição de fosfodiesterases, com consequente perda de peso (Heckman et al., 2010; Cappelletti et al., 2015), o que pode explicar a diminuição do fator de condição dos peixes expostos por 168 horas à cafeína, mas não dos peixes controle no mesmo tempo. Para *P. lineatus*, que é uma espécie que não costuma apresentar variações nos valores de fator de condição entre populações (Rocha et al., 1997), a diminuição desse parâmetro nos animais expostos à cafeína durante 168 horas parece ocorrer devido aos seus efeitos na lipólise. Contudo, esta perda de peso não influenciou no comportamento de natação espontânea, em que os peixes expostos mantiveram os padrões de distância percorrida. Vale ressaltar, contudo, que este parâmetro não variou entre os tempos devido à manutenção do tempo de movimento, e não ao aumento da velocidade, pois nados em tiros (“dart swimming”) requerem energia e potência muscular. Tran et al. (2017) já reportaram que a cafeína foi capaz de diminuir a velocidade de natação de *Danio rerio*, o que

Capítulo IV

corroborar este estudo, uma vez que *P. lineatus* não apresentou uma atividade natatória frenética.

A acetilcolinesterase (AChE) é uma enzima de extrema importância para o processo de condução nervosa na junção neuromuscular e, em peixes, seu mau funcionamento pode afetar a locomoção, alimentação, fuga e comportamento reprodutivo (Van der Oost et al., 2003; Sarkar et al., 2006). Um estudo realizado por Li e colaboradores (2012) relatou que a cafeína foi capaz de inibir em 30% a atividade da AChE em cérebro de peixes após 168 horas de exposição. Porém, Capolupo e colaboradores (2016), utilizando uma espécie de mexilhão para testar os efeitos da cafeína durante o mesmo período, não encontraram alterações na atividade da AChE. No presente trabalho, a cafeína mostrou um efeito inibitório na atividade muscular da AChE em *P. lineatus* após 168 horas de exposição, o que sugere que o animal estaria passando por uma disfunção nas suas habilidades motoras. Mas, quando analisado o comportamento de natação espontânea e resistência natatória, observou-se que *P. lineatus* não apresentou alteração comportamental após 168 horas de exposição, sugerindo que, mesmo inibida, a AChE não estaria interferindo nos movimentos de natação do peixe. Em 24 horas, quando não foram observadas alterações na atividade da AChE, os animais apresentaram alterações na ocupação da coluna d'água e na resistência natatória quando expostos à maior concentração de cafeína, demonstrando que esta poderia estar interferindo em outro sistema de neurotransmissores, que não a acetilcolina.

P. lineatus é uma espécie que possui hábito detritívoro e, por isso, naturalmente apresenta preferência por ambientes de fundo e próximos às margens dos rios (Resende et al., 1996). Tanto os resultados da análise de preferência por claro ou escuro e de ocupação da coluna d'água reforçaram este comportamento, uma vez que em 24 horas os animais do grupo controle permaneceram mais tempo no estrato inferior, explorando menos os outros estratos, e também mantiveram-se a maior parte do tempo do teste na parte escura do aquário. Apesar deste último comportamento ter sido comum para todos os peixes de todos os grupos e em ambos os tempos experimentais, a cafeína demonstrou um possível efeito ansiogênico nos peixes expostos à maior concentração, ao ser considerado o teste de ocupação da coluna d'água, em que os animais permaneceram 100% do tempo do teste no estrato inferior, não explorando os estratos médio e superior. Contudo, isso não foi confirmado pelo teste claro-escuro. Em estudos que exploraram os

Capítulo IV

efeitos da cafeína em *Danio rerio*, também foi detectada uma preferência dos animais pelo estrato inferior, corroborando os resultados com o presente trabalho (Egan et al., 2009; Ladu et al., 2015).

Em 168 horas, os peixes do grupo CTR permaneceram durante todo o ensaio no estrato inferior, podendo-se sugerir que este comportamento seja consequência de um estresse associado ao jejum. Neste caso, mesmo não tendo sido observada uma diferença significativa na ocupação entre os grupos, a comparação entre estratos em cada grupo indicou que os animais expostos à cafeína exploraram estratos superiores, corroborando os resultados de tempo e distância percorrida, os quais demonstraram claramente que os peixes que permaneceram em contato com a cafeína mantiveram-se ativos, mas de forma lenta. Do mesmo modo, ainda não é possível associar este comportamento a uma possível ansiólise, pois esta também não foi detectada no teste claro-escuro. Além disso, a cafeína, geralmente, está associada à efeitos ansiogênicos como redução da exploração, aumento de movimentos erráticos e comportamento de congelamento (Egan et al., 2009; Tran et al., 2017).

Portanto, em um tempo de exposição curto (24 h) e em peixes com condições nutricionais favoráveis, a cafeína exerce, claramente, seu papel como estimulante do sistema nervoso central, contribuindo para a diminuição da fadiga e fazendo o animal resistir mais ao fluxo contracorrente. Já em maiores tempos de exposição (168 h) e na condição de jejum, a cafeína parece contribuir com a manutenção no padrão de natação espontânea. Contudo, aos serem colocados em um fluxo onde se exige energia e explosão muscular, os peixes expostos à cafeína possuem a mesma resistência natatória que os animais do grupo controle. Também é nítido que o fato de a cafeína alterar a atividade da AChE não influencia no comportamento do peixe, uma vez que as alterações comportamentais observadas aparentam estar mais relacionadas aos efeitos da cafeína nos receptores de adenosina. Diante disso, é possível atribuir à cafeína propriedades estimulantes, mas não necessariamente classificá-la como ansiolítica ou ansiogênica para *P. lineatus*, considerando as análises realizadas. Assim, este trabalho contribuiu não apenas com a investigação dos efeitos da cafeína em concentrações ambientalmente relevantes, mas também por ampliar o conhecimento desses efeitos para uma espécie de peixe neotropical.

Referências Bibliográficas

- Alves Costa, J.R.M., Mela, M., Silva De Assis, H.C., Pelletier, E., Randi, M.A.F., Oliveira Ribeiro, C.A., 2007. Enzymatic inhibition and morphological changes in *Hoplias malabaricus* from dietary exposure to lead (II) or methylmercury. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 67, 82-88.
- Bonga, S.E.W., 2011. Hormonal responses to stress. In: Farrel, A.P. **Encyclopedia of fish physiology: from genome to environmental**. Elsevier: London, 1515-1523.
- Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, 72, 248-254.
- Burdan, F., 2015. Pharmacology of Caffeine: The Main Active Compound of Coffee. In: Preddy, V., **Coffee in health and disease prevention**, cap. 90, Elsevier: London, 823-829.
- Campanha, M.B., Awan, A.T., Sousa, D.N.R., Grosseli, G.M., Mozeto, A.A., Fadini, P.S.A., 2015. 3-year study on occurrence of emerging contaminants in an urban stream of São Paulo State of Southeast Brazil. **Environmental Science Pollutant Research**, 22, 7936–7947.
- Canela, M.C., Jardim, W.F., Sodr e, F.F., Grassi, M.T., 2014. **Cafeína em águas de abastecimento público no Brasil/ Instituto Nacional de Ciências e Tecnologias Anal ticas Avan adas-INCTAA**. São Carlos: Editora Cubo, 96 p.: il.
- Capolupo, M., Valbonesi, P., Kiwana, A., Buratti, S., Franzellitti, S., Fabbri, E., 2016. Use of an integrated biomarker-based strategy to evaluate physiological stress responses induced by environmental concentrations of caffeine in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*, **Science of the Total Environment**, 563–564, 538–548.
- Cappelletti, S., Daria, P., Sani, G., Aromatario, M., 2015. Caffeine: cognitive and physical performance enhancer or psychoactive drug? **Current Neuropharmacology**, 13, 71-88.

Capítulo IV

- Chellappa, S., Huntingford, F.A., Strang, R.H.C., Thomson, R.Y., 1995. Condition factor and hepatosomatic index as estimates of energy status in male three-spined stickleback. **Journal of Fish Biology**, 47, 775-787.
- Colin, N., Porte, C., Fernandes, D., Barata, C., Padrós, F., Carrassón, M., Monroy, M., Cano-Rocabayera, O., Sostoa, A., Piña, B., Maceda-Veiga, A., 2016. Ecological relevance of biomarkers in monitoring studies of macro-invertebrates and fish in Mediterranean rivers. **Science of the Total Environment**, 540, 307–323.
- Edwards, Q.A., Kulikov, S.M., Garner-O’Neale, L.D., 2015. Caffeine in surface and wastewaters in Barbados, West Indies. **Springer Plus**, 4, 1-12.
- Egan, R.J., Bergner, C.L., Hart, P.C., Cachet, J.M., Canavello, P.R., Elegante, M.F., Elkhayat, S.I., Bartels, B.K., Tien, A.K., Tien, D.H., Mohnot, S., Beeson, E., Glasgow, E., Amri, H., Zukowska, Z., Kalueff, A.V., 2009. Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. **Behavioural Brain Research**, 205, 38–44.
- Heckman, M.A., Weil, J., Demejia, E.G., 2010. Caffeine (1, 3, 7-trimethylxanthine) in foods: a comprehensive review on consumption, functionality, safety, and regulatory matters. **Journal of Food Science**, 75 (3), 77-87.
- Jorge, L.A.C., 2005. Software para avaliação do comportamento de insetos. Circular Técnica 30, 1ª edição - Embrapa CNPDIA, São Carlos.
- Ladu, F., Mwaffo, V., Li, J., Macri, S., Porfiri, M., 2015. Acute caffeine administration affects zebrafish response to a robotic stimulus. **Behavioural Brain Research**, 289, 48-54.
- Li, Z., Lu, G., Yang, X., Wang, C., 2012. Single and combined effects of selected pharmaceuticals at sublethal concentrations on multiple biomarkers in *Carassius auratus*. **Ecotoxicology**, 21, 353-361.
- Matamoros, V., Arias, C.A., Nguyen, L.X., Salvadó, V., Brix, H., 2012. Occurrence and behavior of emerging contaminants in surface water and a restored wetland. **Chemosphere**, 88, 1083–1089.
- Maximino, C., Brito, T.M., Batista, A.W.S., Herculano, A.M., Morato, S., Gouveia Jr., A., 2010. Measuring anxiety in zebrafish: a critical review. **Behavioural Brain Research**, 214, 157-171.
- Montagner, C.C., Jardim, W.F., Von Der Ohe, P.C., Umbuzeiro, G.A., 2014. Occurrence and potential risk of triclosan in freshwaters of São Paulo, Brazil—

Capítulo IV

- the need for regulatory actions. **Environmental Science Pollution Research**, 21, 1850–1858.
- Resende, E.K., Catella, A.C., Palmeira, S.S., Pereira, R.A.C., Lima, M.S., Almeida, V.L.L., 1996. Biologia do curimatá (*Prochilodus lineatus*), pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) e cachara (*Pseudoplatystoma fasciatum*) na bacia hidrográfica do rio Miranda, Pantanal, Mato Grosso do Sul, Brasil. Corumbá, MS: EMBRAPA - CPAP. **Boletim de Pesquisa**, 2, 1-75.
- Richendrfer, H., Pelkowski, S.D., Colwill, R.M., Creton, R., 2012. On the edge: pharmacological evidence for anxiety-related behavior in zebrafish larvae. **Behavior Brain Research**, 228 (1), 99-106.
- Rocha, M.A., Ribeiro, E.L.A., Mizubuti, I.Y., 1997. Comparação entre os fatores de condição de fulton e alométrico em curimatá (*Prochilodus lineatus*) criados em dois ambientes. **Arch. Latinoam. Prod. Anim**, 5 (1), 459-460.
- Rodriguez, R.S., Haugen, R., Rueber, A., Huang, C.C., 2014. Reversible neuronal and muscular toxicity of caffeine in developing vertebrates. **Comparison Biochemical Physiology and Toxicology Pharmacology**, 163, 47–54.
- Sarkar, A., Ray, D., Shrivastava, A.N., Sarker, S., 2006. Molecular biomarkers: their significance and application in marine pollution monitoring. **Ecotoxicology**, 15, 333–340.
- Sawynok, J., Yaksh, T.L., 1993. Caffeine as an analgesic adjuvant: a review of pharmacology and mechanisms of action. **Pharmacological Reviews**, 45 (1), 45-85.
- Scott, G.R., Sloman, K.A., 2004. The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. **Aquatic Toxicology**, 68, 369–392.
- Serra, E.L., Medalha, C.C., Mattioli, R., 1999. Natural preference of zebrafish (*Danio rerio*) for a dark environment. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 32, 1551-1553.
- Simonato, J.D., Mela, M., Doria, H.B., Guiloski, I.C., Randi, M.A.F., Carvalho, P.S.M., Meletti, P.C., Assis, H.C.S., Bianchini, A., 2016. Biomarkers of waterborne copper exposure in the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Aquatic Toxicology**, 170, 31-41.

Capítulo IV

- 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 Pollution**, 206, 57–67.
- Svennigsson, P., Nomikos, G.G., Fredholm, B.B., 1999. The stimulatory action and the development of tolerance to caffeine is associated with alterations in gene expression in specific brain regions. **Journal of Neuroscience**, 19 (10), 4011-4022.
- Tran, S., Fulcher, N., Nowicki, M., Desai, P., Tsang, B., Facciol, A., Chow, H., Gerlai, R., 2017. Time-dependent interacting effects of caffeine, diazepam, and ethanol on zebrafish behavior. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, 75, 16-27.
- Van Der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 13, 57-149.

CAPÍTULO V**Efeitos do triclosan sobre as respostas de biomarcadores do peixe
*Prochilodus lineatus***

Capítulo V

Efeitos do triclosan sobre as respostas de biomarcadores do peixe *Prochilodus lineatus*

Thais Graciano Santos Silva^{1*}, Laura Lui de Andrade¹, Raphael Danna Acayaba²,
Cassiana Carolina Montagner Raimundo², Cláudia Bueno dos Reis Martinez¹

¹Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Estadual de Londrina, 86051-990, Londrina, Paraná, Brasil.

²Laboratório de Química Ambiental, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, 13083-970, Campinas, São Paulo, Brasil.

*autor para correspondência: thaisgsantos8@hotmail.com

RESUMO

O triclosan (TCS) é um agente antimicrobiano amplamente utilizado em produtos de higiene pessoal, veterinários e industriais e tem se destacado mundialmente como sendo um dos principais contaminantes emergentes encontrados em ecossistemas aquáticos. A fim de contribuir para a investigação das consequências da presença desse composto para a biota aquática, o objetivo deste trabalho foi avaliar, por meio de diferentes biomarcadores, os efeitos do TCS nas concentrações de 0,1, 1 e 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para a espécie de peixe da região Neotropical *Prochilodus lineatus* após 24 e 168 horas de exposição. Constatou-se aumento na ocorrência de peroxidação lipídica no fígado dos peixes expostos a maior concentração de TCS durante 168 horas, porém não foram observadas alterações nos principais antioxidantes enzimáticos e nas enzimas de biotransformação. O TCS também não ocasionou danos oxidativos em proteínas e danos no DNA, assim como não alterou a atividade cerebral e muscular da acetilcolinesterase. Apesar dos peixes expostos às duas maiores concentrações de triclosan terem apresentado uma diminuição na atividade branquial da H^+ -ATPase após 24 horas, não foram observadas mudanças na atividade da Na^+/K^+ -ATPase e anidrase carbônica, bem como nos níveis plasmáticos do Na^+ e Cl^- em nenhum dos tempos experimentais. Alterações em parâmetros hematológicos também não foram constatadas. Contudo, após 168 horas de exposição, o triclosan ocasionou a morte de peixes da maior concentração. Diante disso, pode-se concluir que apenas a maior concentração de triclosan, no tempo de exposição mais longo, promoveu efeitos deletérios em *P. lineatus*.

Palavras-chave: biotransformação, contaminantes emergentes, estresse oxidativo, íons plasmáticos, osmorregulação, parâmetros hematológicos.

Capítulo V

1. Introdução

O triclosan (5-cloro-2-(2,4-diclorofenoxi)-fenol) é um composto orgânico antimicrobiano utilizado em desinfetantes, sabonetes, detergentes, pasta de dentes, desodorantes e vários outros produtos de higiene pessoal, produtos veterinários e industriais. Foi sintetizado pela primeira vez no início da década de 1960 pela empresa suíça Ciba-Geigy e desde então tem sido empregado como um dos principais princípios ativos de produtos bactericidas em diversos países (Jones et al., 2000; Dann; Hotela, 2011). O principal modo de ação do triclosan é bloquear a síntese de lipídios pela FabI (enoil-acil redutase), impedindo a formação da membrana citoplasmática bacteriana (McMurry et al., 1998; Russel, 2004). Sendo assim, o triclosan possui alta eficiência microbicida, atingindo um amplo espectro, incluindo bactérias gram positivas e gram negativas (Escalada et al., 2005).

Devido a sua eficácia, o consumo mundial de triclosan é de, aproximadamente, 1500 toneladas por ano. Contudo, estes dados podem refletir consequências negativas como o aumento de resistência bacteriana e a contaminação aquática (Yazdankhah et al., 2006; Gao et al., 2014). Diferente dos fármacos que são ingeridos e metabolizados pelo organismo humano, produtos de higiene pessoal contendo triclosan são utilizados externamente e, após o enxague, seus resíduos acabam sendo introduzidos nos sistemas hídricos através de esgotos urbanos e industriais (Von der Ohe et al., 2012; Escarrone et al., 2016). Entretanto, as estações de tratamento de águas residuais convencionais são ineficientes na remoção total de triclosan, fazendo com que este composto esteja cada vez mais presente em ecossistemas aquáticos naturais (Petrovic et al., 2003; Luo et al., 2014).

Em diversos países já existe uma preocupação com a restrição do uso de triclosan em produtos como plástico e cosméticos, porém ainda não existem regulamentações sobre a concentração máxima permitida de triclosan em ambientes aquáticos (Lee e Chu, 2013). Estudos apontam que o triclosan é frequentemente encontrado em águas superficiais em concentrações que variam de 0,2 a 478 ng/L (revisado por Montagner et al., 2014). Também, o triclosan pode apresentar elevada persistência em ecossistemas aquáticos devido a sua alta adsorção ao sedimento (Singer et al., 2002). Diante da presença constante (mesmo que em baixas concentrações) de triclosan em amostras de água, da falta de legislações que o inclui em programas de monitoramento ambiental e dos possíveis efeitos adversos

Capítulo V

que isto poderia causar na biota aquática, o triclosan pode ser classificado como um contaminante emergente (Stuart et al., 2012; USEPA, 2016).

Além de ser constantemente encontrado em corpos d'água, o triclosan apresenta um risco maior para as comunidades aquáticas devido a sua alta capacidade de reagir com o radical hidroxil ($\bullet\text{OH}$) formando as dioxinas, moléculas extremamente tóxicas para os seres vivos (Gao et al., 2014). Além disso, o próprio triclosan, assim como outros contaminantes, pode estimular vias metabólicas que aumentem a produção de $\bullet\text{OH}$, o qual pode ocasionar danos em lipídios, proteínas e DNA (Hermes-Lima, 2004). Estudos ecotoxicológicos vêm sendo realizados para investigar os efeitos do triclosan para invertebrados e peixes através de biomarcadores relacionados às defesas antioxidantes e estresse oxidativo, e alguns já demonstraram que o triclosan pode interferir em enzimas antioxidantes e ocasionar danos oxidativos (Binelli et al., 2009; Binelli et al., 2011; Lin et al., 2010; Ku et al., 2014). Contudo, deve-se estender esta investigação para outros tipos de biomarcadores, pois a ampliação destas análises colabora com a estimativa da toxicidade deste composto para a vida aquática.

A pesquisa dos processos osmorregulatórios em animais aquáticos, principalmente de peixes, é extremamente importante para a investigação dos efeitos de contaminantes, visto que a manutenção deste processo depende de diversos fatores e a presença de contaminantes pode interferir nessa homeostase (Evans et al., 2005). Sabe-se que os metais são contaminantes que podem ocasionar efeitos na osmorregulação de peixes e, por isso, existem muitos trabalhos que exploram este assunto (Camargo et al., 2009; Silva e Martinez, 2014; Ribeiro et al., 2014), mas também outros xenobióticos são capazes de desregular esse processo (Paulino et al., 2012; Simonato et al., 2013). Portanto, ainda que não existam trabalhos que descrevam os efeitos do triclosan na osmorregulação de peixes, é necessário que se façam estudos que abordem esta temática (fonte: Sciencedirect; palavras-chave: triclosan osmoregulation).

Outros biomarcadores bioquímicos como a atividade de enzimas de biotransformação e atividade da acetilcolinesterase já foram utilizados para a detecção dos efeitos do triclosan em organismos aquáticos (Binelli et al., 2011; Matozzo et al., 2012; Ku et al., 2014). Porém, é interessante que a aplicação desta variedade de biomarcadores ocorra nas mais variadas espécies, para que sejam obtidos dados consistentes de como essa substância pode interagir nos processos

Capítulo V

fisiológicos dos organismos e as possíveis variações que podem ocorrer entre espécies de ambientes diferentes (Nikinmaa, 2014). O peixe *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) é uma espécie que vem sendo amplamente utilizada como modelo experimental em ensaios ecotoxicológicos realizadas na América do Sul por ser uma espécie nativa da região Neotropical e por demonstrar sensibilidade a diversos contaminantes (Simonato et al., 2008; Santos e Martinez, 2012; Simonato et al., 2016). Entretanto, estudos que investiguem os efeitos de contaminantes emergentes para esta espécie são praticamente inexistentes até o momento (Navarro e Martinez, 2014; Miranda et al., 2016).

Visto que o triclosan é uma substância que tem se destacado como um dos principais contaminantes emergentes de ambientes aquáticos, incluindo rios brasileiros (Montagner et al., 2014), e que ainda são poucos estudos que demonstram seus efeitos em espécies de peixes da região Neotropical, o presente trabalho teve como objetivos avaliar os efeitos do triclosan para a espécie de peixe *Prochilodus lineatus* utilizando biomarcadores relacionados à biotransformação e estresse oxidativo, além de parâmetros relacionados ao equilíbrio osmoiônico e parâmetros hematológicos.

2. Material e Métodos

A metodologia descrita para realização deste trabalho foi aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (Processo CEUA nº 19618.2013.57).

2.1 Desenho Experimental

Espécimes juvenis de *Prochilodus lineatus* (n= 70; 25,9 ± 1,3g; 10,4 ± 0,2cm), fornecidos pela Estação de Piscicultura da Universidade Estadual de Londrina (EPUEL) e Piscicultura Aqua Norte (Cambará-PR), foram aclimatados durante sete dias em tanques de 300 L contendo água desclorada e aeração constante. Durante este período, os animais foram alimentados a cada 48 horas com ração comercial e foram verificados diariamente os parâmetros físicos e químicos da água (pH 7,79 ± 0,06, condutividade 0,153 ± 0,01 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$, oxigênio dissolvido 7,77 ± 0,6 $\text{mgO}_2\cdot\text{L}^{-1}$, temperatura 22,74 ± 0,3 °C).

As soluções estoque de triclosan (Sigma-Aldrich – CAS 3380-34-5) foram obtidas a partir da dissolução em metanol, obtendo-se as concentrações finais nos

Capítulo V

aquários de 0,1; 1 e 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de triclosan (denominando-se os respectivos grupos de TCS 0,1, TCS 1 e TCS 10). Um quarto aquário recebeu o volume de 0,125 $\mu\text{L.L}^{-1}$ do solvente metanol (denominado grupo CTR), equivalente ao volume utilizado nos aquários que receberam a solução de triclosan. As concentrações de triclosan escolhidas foram baseadas em trabalhos que relataram concentrações semelhantes em ambientes aquáticos naturais (Lindström et al., 2002; Montagner et al., 2014).

Após o período de aclimação, grupos de 7 peixes foram transferidos para os respectivos aquários e permaneceram nestas condições durante 24 horas e 168 horas, sendo que neste último tempo experimental ocorreu a renovação total de água a cada 48 horas, com fornecimento de ração para alimentação 30 minutos antes de cada renovação. Uma alíquota de água foi retirada de cada aquário, sempre antes da transferência dos animais (t0 e t24 – para o teste de 24 horas; t0 e t48 – para o teste de 168h) e armazenadas em frascos âmbar, para posteriores análises das concentrações de triclosan.

Passados os períodos de exposição, os peixes foram retirados dos aquários e anestesiados em benzocaína (0,1 g.L^{-1}) para a coleta de sangue pela veia caudal. Então, os animais foram mortos por secção medular para a retirada das brânquias, fígado, cérebro e amostra de músculo. Os órgãos foram armazenados em ultrafreezer (-80°C) para análises posteriores.

2.2 Extração e Quantificação do Triclosan

A quantificação do triclosan foi realizada por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem (LC-MS/MS). Foi utilizado um cromatógrafo Agilent modelo 1200, equipado com bomba binária, injetor automático e compartimento de coluna termostaticado. A separação cromatográfica foi realizada com uma coluna Zorbax SB-C18 (2,1x30 mm, tamanho de partícula de 3,5 μm) a 25°C. A fase móvel foi constituída de água ultrapura (A) e metanol (B), previamente filtrados em membranas com 0,2 μm de porosidade, contendo 0,01% de hidróxido de amônio, aditivo esse que favorece à formação de íons. A separação se deu no modo de eluição isocrático, com uma proporção de 30% de água para 70% de metanol em 3 minutos. A identificação e a quantificação do triclosan foram realizadas por espectrometria de massas em um equipamento Agilent com triplo quadrúpolo (modelo 6410B). O triclosan foi ionizado em uma fonte de *electrospray* no modo negativo, e foi monitorado pelo modo MRM (*MultipleReactionMonitoring*). As curvas

Capítulo V

analíticas foram construídas de acordo com a área obtida para cada composto em função de sua massa na coluna. O limite de detecção, quantificação e o coeficiente de determinação (r^2) para o triclosan foram $16,2 \text{ ng L}^{-1}$, $49,2 \text{ ng L}^{-1}$ e $0,991$, respectivamente.

2.3 Análises Hematológicas e Plasmáticas

Com uma alíquota do sangue retirado, foi mensurada a porcentagem de células vermelhas através da centrifugação em microcapilar (1200 g , 5 min) e posterior leitura em cartão próprio. Outra alíquota foi adicionada em tampão formol-citrato (130 mM citrato de sódio em formol $0,4\%$) para o cálculo do número de eritrócitos, através de contagem em câmara de Neubauer ao microscópio óptico. O resultado foi expresso em número de células por milímetro cúbico de sangue ($n^\circ \text{ céls.mm}^{-3}$). Para a estimativa do conteúdo de hemoglobina do sangue foi utilizado método colorimétrico com cianeto da meta-hemoglobina (HiCN), utilizando-se kit comercial (Doles, Brasil), em espectrofotômetro (540 nm). O conteúdo de hemoglobina foi apresentado em g.dL^{-1} .

Após, o sangue foi centrifugado (1870 g , 15 min) e com o plasma foram feitas as análises dos íons sódio e potássio, a partir de uma diluição em água deionizada ($1:100$) e posterior leitura em fotômetro de chama. Para medir o íon cloreto foi utilizado o método do tiocianato de mercúrio (Labtest Diagnóstica, Brasil) em espectrofotômetro de placas em 470 nm . As concentrações dos íons citados foram expressas em mM . A quantificação de glicose plasmática foi realizada através do método da glicose oxidase (Labtest Diagnóstica, Brasil) em espectrofotômetro de microplacas em 505 nm e expresso em mg.dL^{-1} .

2.4 Análises Osmorregulatórias

As brânquias previamente limpas tiveram seus filamentos separados dos arcos branquiais e separados em duas partes para serem homogeneizados ($10x$ do volume). Para a análise das atividades das Na^+/K^+ -ATPase e H^+ -ATPase foi feita uma homogeneização em tampão SEID (150 mM sacarose, 10 mM 50 mM EDTA, imidazol, $2,4 \text{ mM}$ desoxicolato sódico, $\text{pH } 7,5$) e posterior centrifugação (15 min , 7500 g , 4°C). O sobrenadante foi incubado com um tampão contendo ouabaína (inibidor da Na^+/K^+ -ATPase) ou contendo NEM (inibidor da H^+ -ATPase) e foi estimada a produção de fosfato inorgânico proveniente da quebra de ATP durante

Capítulo V

um intervalo de 30 minutos (Gibbs e Somero, 1989). Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol Pi.mg prot}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. Para o ensaio da atividade da anidrase carbônica ocorreu uma homogeneização em tampão (225 mM manitol, 75 mM sacarose, 10 mM Tris–base e 10 mM NaH_2PO_4 , pH 7.4) e centrifugação (10 min, 13.600 g, 4°C). O sobrenadante foi adicionado em uma solução saturada de CO_2 e foi mensurada a redução de pH resultante da liberação de H^+ durante 20 segundos (Vitale et al., 1999). A atividade da AC foi expressa $\text{AC.mg proteína}^{-1}$.

2.5 Análises Bioquímicas

O fígado foi homogeneizado (10X do volume) em tampão fosfato de potássio (0,1 M, pH 7,0) e centrifugado (20 min, 13000 g, 4°C) para as análises bioquímicas. O cérebro e o músculo foram homogeneizados (10x do volume de ambos) em tampão fosfato de potássio (0,1M, pH 7,5) e centrifugados (20 min, 13000 g, 4°C) para a análise da atividade da acetilcolinesterase.

2.5.1 Enzimas de biotransformação

A atividade da etoxiresorufina-O-desetilase (EROD) foi determinada através da conversão da 7-etoxiresorufina, fornecida no meio de reação (tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,6 + NADH 2 mM + 7-etoxiresorufina 0,1 mM), em resorufina pela ação da EROD, de acordo com Eggens e Galgani (1992). O aumento progressivo da fluorescência, resultante da formação de resorufina, foi medido a cada minuto, durante 10 minutos (excitação: 530 nm, emissão: 590 nm). A porção inicial linear da curva foi utilizada para avaliar a taxa de reação e a atividade da EROD foi expressa em $\text{pmol de resorufina.minuto}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$, baseada em uma curva padrão de resorufina.

A atividade da GST foi determinada pela complexação da GSH com o substrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) em espectrofotômetro em 340 nm (Keen et al., 1976) e expressa em $\text{nmol de CDNB conjugados.minuto}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$.

2.5.2 Antioxidante não-enzimático

O conteúdo do tripeptídeo glutathiona (GSH) foi determinado através da reação da glutathiona com o substrato 5,5'-ditiobis-2-ácido nitrobenzóico (DTNB), formando o

Capítulo V

tiolato (TNB) (Beutler et al., 1963), que foi quantificado em 412 nm e expresso em μg de GSH.mg de proteína⁻¹.

2.5.3 Antioxidantes enzimáticos

A atividade da SOD foi estimada pela taxa de redução do citocromo c inibida pelo $\text{O}_2^{\cdot -}$ (resultante da oxidação da xantina pela xantina oxidase), em 550 nm e expressa em U de SOD.mg de proteína⁻¹, sendo que U representa a quantidade de SOD que promove a inibição de 50% da taxa de redução do citocromo c (McCord e Fridovich, 1969). A atividade da CAT foi determinada através da velocidade da decomposição de H_2O_2 pela enzima, onde foi avaliado o decréscimo de absorvância em 240 nm (Beutler, 1975) e essa atividade foi expressa em μmol de H_2O_2 .minuto⁻¹.mg de proteína⁻¹. A atividade de GPx foi estimada através da oxidação do NADPH em presença de H_2O_2 , em espectrofotômetro em 340 nm e expressa em μmol de NADPH oxidado.minuto⁻¹.mg de proteína⁻¹ (Hopkins e Tudhope, 1973). A atividade da GR foi mensurada de forma indireta através da redução do NADPH promovida pela glutatona oxidada (GSSG) (Carlberg e Mannervik, 1975), em 340 nm e expressa em μmol NADPH oxidado. minuto⁻¹.mg de proteína⁻¹.

2.5.4 Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica foi determinada por meio da quantificação do malondialdeído (MDA), que é um dos produtos finais da peroxidação lipídica. Foi empregado o ensaio TBARS, que mede as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA), em espectrofotômetro a 530 nm (Federici et al., 2007). A peroxidação lipídica foi expressa em equivalentes de MDA como μmol de MDA.mg de proteína⁻¹.

2.5.5 Proteínas carboniladas

A quantificação de grupamentos carbonilas foi realizado a partir da reação das proteínas carboniladas com o 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) em ácido clorídrico em espectrofotômetro 370nm (Levine et al., 1994). O conteúdo de proteínas carboniladas foi expresso em nmol carbonila. mg de proteína⁻¹.

2.5.6 Atividade da acetilcolinesterase (AChE)

Capítulo V

A atividade da AChE foi determinada nos tecidos cerebral e muscular por meio da quantificação do produto da reação da acetilcolina com o DTNB (5,5'-ditiobis-2-ácido nitrobenzóico) (Alves Costa et al., 2007). A medida obtida de absorvância em 415 nm foi expressa em nmol de DTNB.minuto⁻¹.mg de proteína⁻¹.

2.5.7 Concentração de proteínas

A concentração de proteínas totais das amostras utilizadas nos ensaios bioquímicos foi medida através do método de Bradford (1976), baseando-se em uma curva padrão de albumina de soro bovino (BSA), em espectrofotômetro a 595 nm.

2.6 Análises Genéticas – Ensaio do cometa

O ensaio alcalino do cometa foi realizado de acordo com Singh et al. (1988) com algumas modificações (Vanzella et al., 2007). Com as amostras de sangue conservadas em soro bovino fetal (SBF) foi feito o teste de exclusão do azul de trypan, para avaliar a viabilidade celular das amostras, que foi aceita a partir de 80% de células viáveis. Então, alíquotas da suspensão celular foram adicionadas à agarose de baixo ponto de fusão 0,5% e esta mistura foi distribuída em duas lâminas previamente recobertas com agarose normal 1,5%. As lâminas foram cobertas com lamínulas e mantidas resfriadas (4°C). Após 40 minutos as lamínulas foram retiradas e as lâminas foram colocadas em cubas contendo solução de lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10mM Tris, 10% DMSO, 1 mL Triton X-100, pH 10,0) por, pelo menos, 1 hora, também sob refrigeração. Em seguida, as lâminas foram acondicionadas durante 30 minutos em tampão de desnaturação (0,3 N NaOH, 1 mM EDTA, pH > 13), dentro de cubas horizontais envoltas por gelo, para posterior corrida de eletroforese (1 V.cm⁻¹; 300mA) durante 20 minutos. Após a eletroforese, as lâminas foram recobertas com tampão de neutralização (0,4 M Tris, pH 7,5) por 15 minutos, com renovação completa do tampão a cada 5 minutos. Após a terceira neutralização as lâminas secaram em posição inclinada e foram fixadas em etanol durante 10 minutos.

Para as análises, as lâminas coradas com gelRed (Uniscience) foram examinadas ao microscópio de fluorescência na objetiva de 40x e foram analisados 100 nucleóides por animal. Os danos no DNA foram classificados considerando-se o tamanho da cauda do cometa, em 4 classes: classe 0 = sem dano aparente; classe 1 = cauda curta menor que o diâmetro do núcleo; classe 2 = comprimento da cauda

Capítulo V

correspondendo a uma ou duas vezes o diâmetro do núcleo; classe 3 = comprimento da cauda maior que o dobro do diâmetro do núcleo. A partir dessa classificação foi calculado o escore de danos no DNA para cada tecido, de cada indivíduo, pela soma do valor da multiplicação do número de nucleóides encontrados em cada classe pelo valor da classe.

2.7 Análises Estatísticas

Os resultados dos diferentes parâmetros analisados para cada grupo experimental (CTR, TCS 0,1, TCS 1 e TCS 10), em cada tempo experimental, foram comparados entre si por meio de análise de variância paramétrica (ANOVA) ou não-paramétrica (Kruskall-Wallis), de acordo com a distribuição dos dados (normalidade e homogeneidade de variância). Foram considerados significativos valores de $P < 0,05$.

3 Resultados

3.1 Mortalidade dos Animais

Não houve mortalidade dos peixes durante o período de aclimação e no experimento de 24 horas. Porém, durante o experimento de 168 horas, ocorreu mortalidade de peixes do grupo TCS 10 na proporção de 37,5%.

3.2 Quantificação de Triclosan na Água

Os valores de triclosan detectados na água dos aquários dos diferentes tratamentos, coletadas imediatamente antes e após cada renovação (24 h) estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Concentração de Triclosan ($\mu\text{g.L}^{-1}$) na água dos aquários experimentais, no tempo inicial (t 0h) e final (t 24h) de cada renovação.

	CTR	TCS 0,1	TCS 1	TCS 10
t 0h	N.D.	0,04 ± 0,00	1,31 ± 0,02	10,60 ± 0,06
t 24h	N.D.	0,10 ± 0,00	0,7 ± 0,00	5,20 ± 0,02

Valores de média ± erro padrão e N=3. N.D. = não detectado

Capítulo V

3.3 Análises Bioquímicas

Com relação às enzimas de biotransformação, não foram observadas diferenças significativas nas atividades da EROD e da GST (Figura 1A) dos peixes submetidos aos diferentes tratamentos (CTR, TCS 0,1, TCS 1 e TCS 10) em ambos os tempos experimentais (24 e 168 h). A atividade da enzima GR não apresentou alterações estatisticamente diferentes entre os peixes dos grupos experimentais de 24 h bem como os peixes de 168 h (Figura 1B), assim como o conteúdo de GSH (Figura 1C).

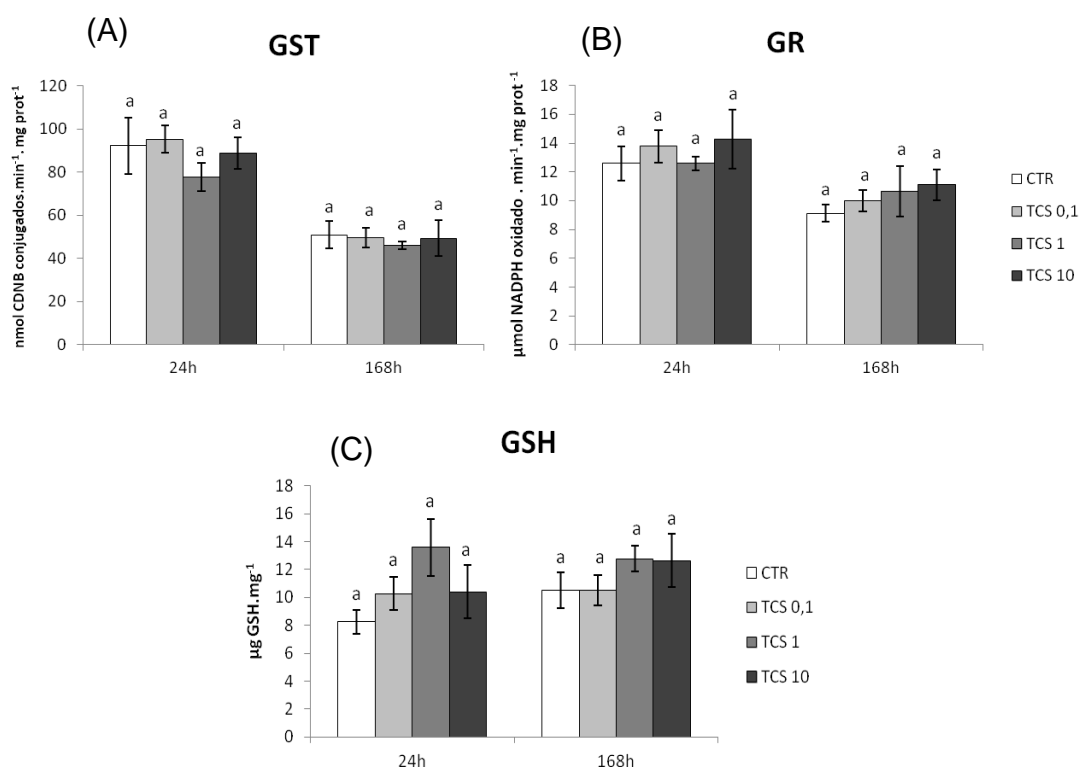


Figura 1: Atividade da Glutaciona S-transferase (GST) (A) e Glutaciona Redutase (GR) (B) e conteúdo de Glutaciona (GSH) (C) no fígado de *Prochilodus lineatus* após exposição a 0,1; 1 ou 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de Triclosan (TCS 0,1; TCS 1 e TCS 10, respectivamente) ou apenas ao metanol (CTR) por 24 h e 168 h ($\bar{x} \pm \text{EP}$; N= 4 a 8). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos para um mesmo tempo de exposição ($P < 0.05$).

Os peixes de ambos os tempos experimentais não apresentaram alterações significativas na atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPx (Figura 2A, 2B e 2C, respectivamente). Também não foram detectadas variações significativas no conteúdo de proteínas carboniladas no fígado dos peixes expostos aos tratamentos experimentais, em nenhum dos tempos experimentais (Figura 3A). Contudo, após 168 horas de exposição à maior concentração de triclosan (TCS 10),

Capítulo V

a peroxidação lipídica no fígado dos peixes foi significativamente maior em relação aos demais tratamentos (Figura 3B).

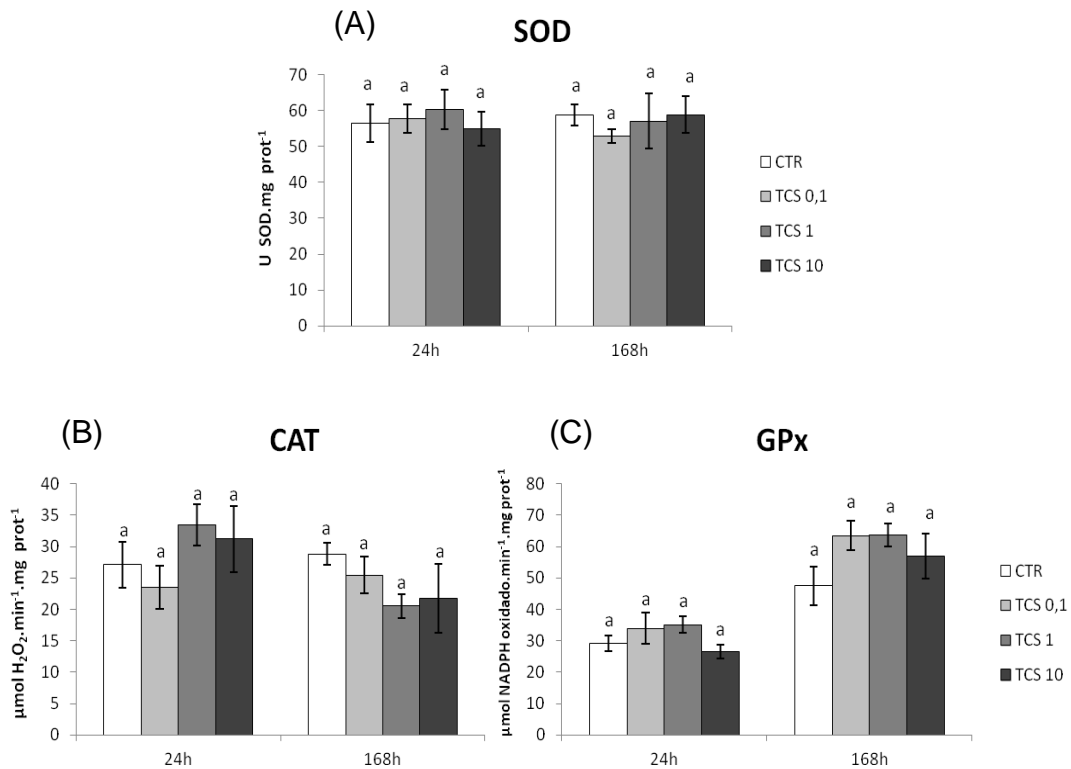


Figura 2: Atividade hepática da Superóxido Dismutase (SOD) (A), Catalase (CAT) (B) e Glutaciona Peroxidase (GPx) (C) de *Prochilodus lineatus* após exposição a 0,1; 1 ou 10 µg.L⁻¹ de Triclosan (TCS 0,1; TCS 1 e TCS 10, respectivamente) ou apenas ao metanol (CTR) por 24 h e 168 h ($\bar{x} \pm EP$; N= 4 a 8). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos para um mesmo tempo de exposição (P < 0.05).

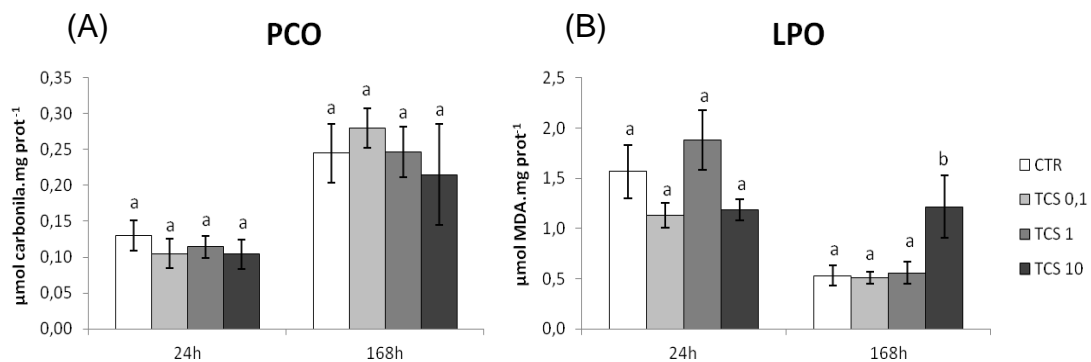


Figura 3: Conteúdo de Proteínas Carboniladas (PCO) (A) e Peroxidação Lipídica (LPO) (B) no fígado de *Prochilodus lineatus* após exposição a 0,1; 1 ou 10 µg.L⁻¹ de Triclosan (TCS 0,1; TCS 1 e TCS 10, respectivamente) ou apenas ao metanol (CTR) por 24 h e 168 h ($\bar{x} \pm EP$; N= 4 a 8). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos para um mesmo tempo de exposição (P < 0.05).

Capítulo V

As atividades da acetilcolinesterase cerebral (Figura 4A) e muscular (Figura 4B) de peixes expostos ao triclosan após 24 e 168 horas não apresentaram alterações significativas quando entre os tratamentos.

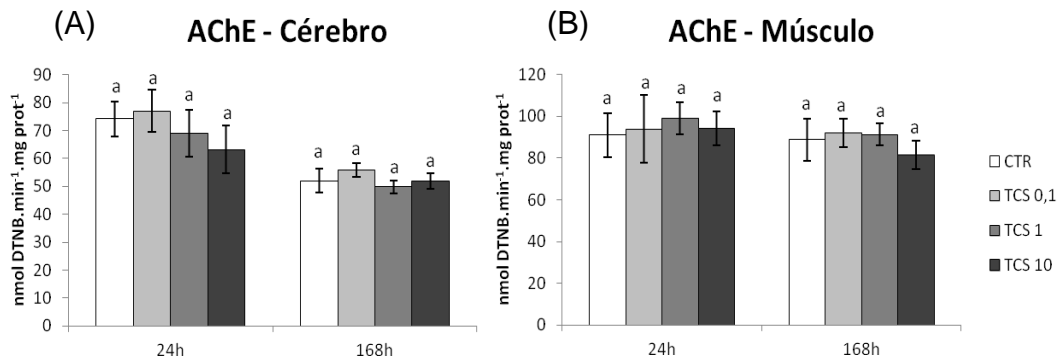


Figura 4: Atividade enzimática da acetilcolinesterase (AChE) de cérebro (A) e músculo (B) de *Prochilodus lineatus* após exposição a 0,1; 1 ou 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de Triclosan (TCS 0,1; TCS 1 e TCS 10, respectivamente) ou apenas ao metanol (CTR) por 24 h e 168 h ($\bar{x} \pm \text{EP}$; N= 4 a 8). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos para um mesmo tempo de exposição ($P < 0.05$).

3.4 Análises Genéticas

Os peixes não apresentaram aumento na ocorrência de danos no DNA de eritrócitos após nenhum dos tratamentos experimentais, em ambos os tempos de exposição, como pode ser observado pelo escore de danos (Figura 5) e pelo número de nucleoides danificados (Tabela 2).

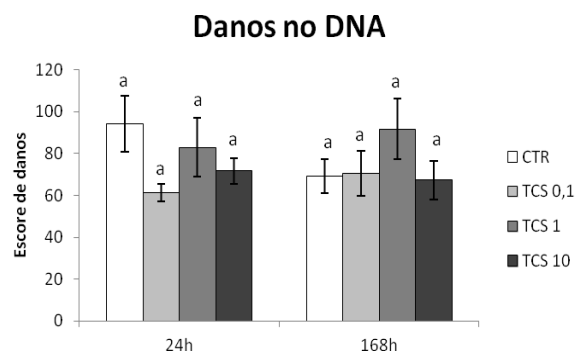


Figura 5: Escore de danos no DNA de eritrócitos de *Prochilodus lineatus* após exposição a 0,1; 3 ou 30 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de Triclosan (TCS 0,1; TCS 1 e TCS 10, respectivamente) ou apenas ao metanol (CTR) por 24 h e 168 h ($\bar{x} \pm \text{EP}$; N= 4 a 8). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos para um mesmo tempo de exposição ($P < 0.05$).

Capítulo V

Tabela 2: Número de nucleoides danificados em eritrócitos de *Prochilodus lineatus* após exposição a 0,1; 3 ou 30 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de Triclosan (TCS 0,1; TCS 1 e TCS 10, respectivamente) ou apenas ao metanol (CTR) por 24 h e 168 h

Tratamentos	Classes de Danos				Número de nucleoides danificados	
	0	1	2	3		
24h	CTR	27,7 \pm 5,4	57,7 \pm 3,8	7,1 \pm 3,0	7,4 \pm 3,8	72,3 \pm 5,0
	TCS 0,1	47,7 \pm 4,7	47,1 \pm 4,4	5,1 \pm 1,5	0,0 \pm 0,0	55,2 \pm 3,9
	TCS 1	34,1 \pm 8,1	49,6 \pm 5,4	15,6 \pm 7,1	0,7 \pm 0,5	65,9 \pm 7,5
	TCS 10	42,7 \pm 5,0	44,1 \pm 4,9	11,9 \pm 2,8	1,3 \pm 0,6	57,3 \pm 4,6
168h	CTR	40,3 \pm 6,1	50,3 \pm 4,5	9,3 \pm 2,4	0,0 \pm 0,0	59,7 \pm 5,2
	TCS 0,1	42,0 \pm 6,1	47,3 \pm 3,4	10,1 \pm 4,1	1,0 \pm 0,7	58,4 \pm 7,1
	TCS 1	30,9 \pm 5,8	49,9 \pm 3,5	16,0 \pm 4,9	3,3 \pm 2,8	69,1 \pm 6,1
	TCS 10	40,5 \pm 7,0	51,8 \pm 5,3	7,8 \pm 3,0	0,0 \pm 0,0	59,5 \pm 6,3

Valores de $\bar{x} \pm \text{EP}$. N= 4 a 8. Diferença significativa se $P < 0,05$.

3.5 Análises Osmorregulatórias

A atividade branquial da enzima H^+ -ATPase (Figura 6A) dos peixes dos grupos TCS 1 e TCS 10 demonstrou estar diminuída quando comparada aos peixes dos grupos CTR no experimento de 24 horas. Porém, após 168 horas de exposição não foi observada esta diferença. As enzimas Na^+/K^+ -ATPase (Figura 6B) e anidrase carbônica (Figura 6C) não tiveram alterações significativas em suas atividades em nenhum tratamento de nenhum tempo experimental.

Capítulo V

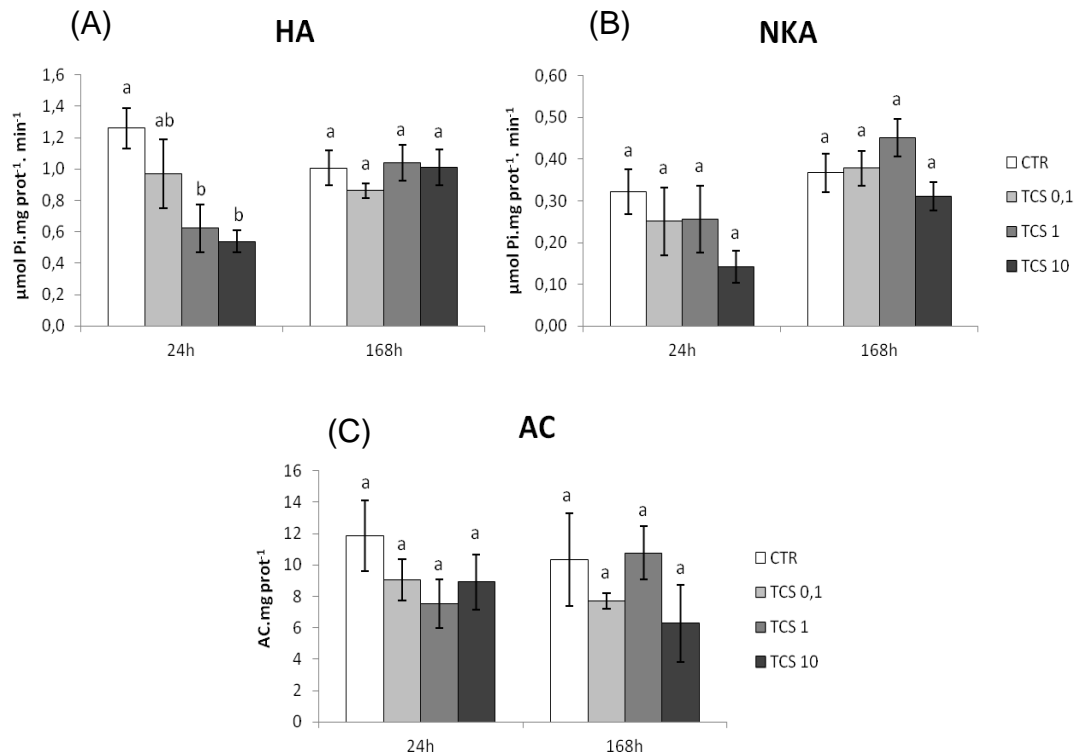


Figura 6: Atividade da H⁺-ATPase (HA) (A), Na⁺/K⁺-ATPase (NKA) (B) e Anidrase Carbônica (AC) (C) em brânquias de *Prochilodus lineatus* após exposição a 0,1; 1 ou 10 µg.L⁻¹ de Triclosan (TCS 0,1; TCS 1 e TCS 10, respectivamente) ou apenas ao metanol (CTR) por 24 h e 168 h ($\bar{x} \pm EP$; N= 4 a 8). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos para um mesmo tempo de exposição (P < 0.05).

3.6 Análises Hematológicas e Plasmáticas

Com exceção dos peixes do grupo TCS 0,1 do experimento de 168 h, que apresentaram um aumento significativo do conteúdo de hemoglobina em relação ao respectivo grupo TCS 10, não foram verificadas outras alterações hematológicas em *P. lineatus* expostos ao triclosan (tabela 3). As concentrações plasmáticas de glicose e dos íons sódio (Na⁺) e cloreto (Cl⁻), também não variaram significativamente entre os grupos experimentais, em nenhum dos períodos de exposição, como pode ser visto na Tabela 3.

Capítulo V

Tabela 3: Número de eritrócitos (RBC), hematócrito (HTO) e conteúdo de hemoglobina (Hb) no sangue total e concentrações plasmáticas de glicose e dos íons sódio (Na⁺) e cloreto (Cl⁻) de *Prochilodus lineatus* após exposição a 0,1; 1 ou 10 µg.L⁻¹ de Triclosan (TCS 0,1; TCS 1 e TCS 10, respectivamente) ou apenas ao metanol (CTR) por 24 h e 168 h.

Tratamentos	Parâmetros						
	RBC	HTO	Hb	Glicose	Na ⁺	Cl ⁻	
24h	CTR	1,61 ± 0,1	35,6 ± 2,0	15,1 ± 1,2	33,0 ± 3,4	124,1 ± 7,5	101,7 ± 6,5
	TCS 0,1	1,76 ± 0,2	36,4 ± 2,7	18,9 ± 1,8	34,0 ± 2,7	135,5 ± 5,0	111,1 ± 4,6
	TCS 1	1,52 ± 0,1	33,1 ± 2,0	16,6 ± 0,8	36,9 ± 2,5	140,1 ± 6,0	117,9 ± 3,8
	TCS 10	1,97 ± 0,3	30,4 ± 2,6	17,2 ± 1,1	41,0 ± 2,9	139,4 ± 4,1	109,9 ± 2,5
168h	CTR	2,99 ± 0,3	39,8 ± 2,6	10,9 ± 0,4ab	86,1 ± 13,3	140,4 ± 6,5	109,6 ± 10,9
	TCS 0,1	2,34 ± 0,2	38,1 ± 1,1	12,9 ± 0,7b	55,2 ± 2,8	149,3 ± 3,1	118,4 ± 7,9
	TCS 1	2,12 ± 0,1	42,9 ± 2,5	10,8 ± 0,9ab	51,3 ± 8,8	154,8 ± 3,2	124,5 ± 7,1
	TCS 10	2,27 ± 0,3	41,3 ± 0,8	8,8 ± 0,8a	83,0 ± 18,0	140,3 ± 3,9	120,8 ± 12,3

Valores de $\bar{x} \pm EP$. N= 4 a 8. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos para um mesmo tempo de exposição ($P < 0,05$).

RBC = n^o céls.mm⁻³; HTC = % de eritrócitos; Hb = g.dL⁻¹; Glicose = mg.dL⁻¹; Na⁺ e Cl⁻ = mM

4. Discussão

Os resultados apresentados neste trabalho demonstraram que a exposição de *P. lineatus* ao triclosan pode afetar o equilíbrio ácido-base após 24 horas e provocar danos oxidativos no fígado após 168 horas. Também, foi constatada mortalidade de 37,5% dos peixes do grupo TCS 10 após 168 horas de exposição, indicando a sensibilidade de *P. lineatus* para esse composto, nessa concentração e após a exposição mais longa. Para outras espécies de peixes a CL₅₀ em 96 horas do triclosan apresenta-se bem maior, como por exemplo, para *Pimephales promelas* que é de 260 µg.L⁻¹ (Orvos et al., 2002), para *Oryzias latipes* que é de 602 µg.L⁻¹ (Ishibashi et al., 2004) e para *Xiphophorus helleri* que é de 1,48 mg.L⁻¹ (Liang et al., 2013). As possíveis causas da letalidade do triclosan para *P. lineatus* serão debatidas adiante, após a discussão de parâmetros importantes para o entendimento deste resultado.

As concentrações utilizadas no presente trabalho foram escolhidas por estarem próximas de concentrações encontradas em ambientes aquáticos naturais (Montagner et al., 2014; Campanha et al., 2015). A variação nas concentrações de triclosan encontradas nos três aquários se deu por este composto possuir

Capítulo V

características químicas bastante peculiares, como por exemplo, sua alta taxa de fotodegradação, grande adsorção ao substrato e seu coeficiente de partição (K_{ow}) e constante de dissociação (pK_a) em pH abaixo de 8,0, o qual colaboram com a sua ionização, facilitando a travessia por membranas biológicas e absorção pelo organismo (Rowett et al., 2016). Porém, a renovação total dos aquários ao longo do experimento possibilitou a constância das concentrações durante todo o ensaio.

Apesar de ser um composto orgânico, o triclosan não foi capaz de alterar a atividade da EROD de *P. lineatus* após as exposições. Essa enzima é extremamente importante para a biotransformação de compostos endógenos e exógenos em peixes e bastante sensível a diversos contaminantes, e por isso, a EROD é um dos biomarcadores mais utilizados para a investigação dos efeitos de compostos orgânicos (Gagnon et al., 2017). Para o crustáceo *Daphnia magna* (Peng et al., 2013) e o peixe *Xiphophorus helleri* (Liang et al., 2013) já foi observado que o triclosan é capaz de induzir a atividade da EROD, demonstrando que essa substância pode ser metabolizada durante a primeira fase da biotransformação de alguns organismos. Entretanto, para *P. lineatus*, as concentrações de triclosan testadas parecem ser muito baixas para alterar a atividade da EROD. Porém, este biomarcador já se demonstrou sensível em *P. lineatus* em exposições a outros contaminantes como a gasolina (Simonato et al., 2011) e a atrazina (Santos e Martinez, 2012). Uma vez que não houve indução de biotransformação de fase I pelo triclosan, poder-se-ia esperar que os peixes expostos ao triclosan pudessem apresentar alterações na fase II da biotransformação. Assim como com a EROD, estudos já demonstraram que o triclosan é capaz de estimular a atividade de GST em outros organismos como invertebrados e embrião de peixe (Oliveira et al., 2009; Binelli et al., 2011). Contudo, a atividade da GST de *P. lineatus* também não apresentou alterações, indicando que o triclosan não deve estar sendo metabolizado por esta via no fígado de *P. lineatus*. Visto que o triclosan é um composto capaz de se acumular em alguns tecidos de organismos aquáticos, como músculo e plasma, e também já foram registradas concentrações de triclosan no plasma e leite de humanos (revisado por Dann e Hontela, 2011), esta hipótese pode ser levada em consideração no presente estudo.

A entrada de xenobióticos no organismo pode desencadear o estresse oxidativo, no qual a produção de espécies reativas de oxigênio excede a capacidade antioxidante do animal (Valavanidis et al., 2006). Dos antioxidantes (SOD, CAT,

Capítulo V

GPx, GR e GSH) avaliados em *P. lineatus*, nenhum apresentou alteração após a exposição ao triclosan. Entretanto, o peixe *P. lineatus* é uma espécie que apresenta sensibilidade nas respostas de biomarcadores relacionados ao estresse oxidativo diante de diversos contaminantes, como, por exemplo, metais (Palermo et al., 2015) e agrotóxicos (Modesto e Martinez, 2010; Santos e Martinez, 2012). Também, em relação à contaminantes emergentes, Navarro e Martinez (2014) observaram que *P. lineatus* pode apresentar alterações nos antioxidantes SOD, CAT, GPx e GSH quando exposto a um surfactante agrícola. Quanto aos efeitos do triclosan para os principais antioxidantes celulares, sabe-se que este composto é capaz de modificar a atividade de antioxidantes enzimáticos em anelídios (Lin et al., 2010) e bivalves (Binelli et al., 2011), demonstrando ser uma substância que pode afetar as principais defesas celulares contra a instalação de um estado de estresse oxidativo.

As principais moléculas que podem ser afetadas pelo excesso de espécies reativas de oxigênio nas células são lipídios, proteínas e o DNA (Lesser, 2012). Como já falado anteriormente, em estudos sobre os efeitos do triclosan em espécies de anelídeos e moluscos foram encontrados alterações nos principais antioxidantes celulares acarretando em danos oxidativos como lipoperoxidação e danos no DNA (Lin et al., 2010; Binelli et al., 2011, Matozzo et al., 2012). Para *P. lineatus*, a exposição ao triclosan pareceu não desencadear danos oxidativos em proteínas e na molécula de DNA. Porém, ao ser analisado o conteúdo de malondialdeído (MDA) no fígado de *P. lineatus*, notou-se que os animais do grupo TCS 10 estão sofrendo danos em lipídios, o que indica que *P. lineatus* está passando por um estado de estresse oxidativo. Os lipídios podem ser moléculas extremamente susceptíveis à toxicidade do triclosan, uma vez que esta substância atua diretamente na síntese de lipídios de organismos alvos através da inibição da enzima enoil-acila redutase, além de possuir uma natureza lipofílica (Dhillon et al., 2015).

A acetilcolinesterase (AChE) é uma enzima relacionada ao sistema neuromotor de animais e amplamente utilizada como biomarcador para investigar os efeitos de contaminantes nas funções sinápticas (Van der Oost et al., 2003, Nikinma, 2014). Alguns autores já detectaram que o triclosan pode alterar a atividade desta enzima em moluscos e peixes (Oliveira et al., 2009; Matozzo et al., 2012). Para *P. lineatus*, mais uma vez, o triclosan não promoveu alteração neste biomarcador, indicando que nestas concentrações e nestes tempos de exposição o triclosan não aparenta ser neurotóxico. Entretanto, *P. lineatus* é uma espécie que demonstra

Capítulo V

bastante sensibilidade neste biomarcador, apresentando alterações nesta enzima quando exposto a agrotóxicos (Modesto e Martinez, 2010; Pereira et al., 2013) e, no caso do cobre, o mau funcionamento da AChE de *P. lineatus* foi associado a alterações comportamentais (Simonato et al., 2016). O triclosan também pode causar alterações comportamentais em peixes, mas, neste caso, os autores não investigaram a atividade da AChE para fazer qualquer tipo de associação (Nassef et al., 2010).

Com relação aos parâmetros analisados nas brânquias, o triclosan promoveu uma diminuição na atividade da HA de *P. lineatus*. Esta enzima participa da manutenção do equilíbrio ácido-base da célula, uma vez que é responsável pela expulsão do H^+ proveniente da dissociação do H_2CO_3 pela AC (Hwang e Lin, 2014). A exposição de *P. lineatus* ao triclosan durante 24 horas pode estar levando a uma acidificação do organismo, já que a AC permaneceu com a atividade inalterada e parece não estar ocorrendo expulsão de H^+ . Além do equilíbrio ácido-base, a HA está intimamente relacionada à captação de íons pelas brânquias, colaborando com a manutenção dos níveis osmóticos de teleósteos dulcícolas (Hwang e Lin, 2014). No presente trabalho, *P. lineatus* não apresentou alteração nos níveis plasmáticos do Na^+ e Cl^- , bem como a atividade da NKA também se manteve inalterada, demonstrando que, apesar da diminuição da HA, o triclosan não foi capaz de ocasionar um desajuste na osmorregulação dos animais. Porém, a espécie escolhida para este estudo já foi amplamente utilizada como modelo experimental em trabalhos sobre os efeitos de contaminantes na osmorregulação e tem demonstrado ser bastante sensível para este tipo de pesquisa (Camargo et al., 2009; Paulino et al., 2012; Simonato et al., 2013; Ribeiro et al., 2014). Também, as concentrações plasmáticas médias de Na^+ e Cl^- relatadas para *P. lineatus* nos trabalhos citados anteriormente são de, aproximadamente, 140 e 120 mM respectivamente, corroborando as encontradas no presente trabalho.

O conteúdo de glicose plasmática pode ser um biomarcador importante para estudos ecotoxicológicos, uma vez que pode indicar uma possível resposta de estresse do animal frente a um contaminante (Bonga, 2011). Para *P. lineatus*, o triclosan pareceu não desencadear uma resposta de estresse, mantendo os níveis glicêmicos normais para todos os tratamentos. Também, o triclosan não ocasionou alterações nos parâmetros hematológicos de *P. lineatus*, sugerindo que apesar do sangue ser um tecido que entra em contato direto com o contaminante, este não

Capítulo V

promoveu efeitos deletérios nas suas células. Também, o triclosan não apresentou genotoxicidade para o DNA dos eritrócitos da espécie estudada, diferentemente do que ocorreu com trutas expostas ao triclosan durante 40 dias (Capkin et al., 2017).

Por mais que o triclosan não tenha alterado a maioria dos biomarcadores testados em *P. lineatus*, a mortalidade que ocorreu após 168 horas provavelmente está relacionada com os danos ocorridos em lipídios do fígado desses animais. As brânquias podem ter sofrido uma acidificação em 24 horas, mas que não é relatada em 168 horas. Portanto, a presença do triclosan em ambientes aquáticos, mesmo em baixas concentrações, pode ser prejudicial para a homeostase da espécie Neotropical *P. lineatus* e o presente trabalho visa contribuir para que medidas sejam tomadas para a regularização do despejo desta substância em ecossistemas aquáticos.

Referências Bibliográficas

- Alves Costa, J.R.M., Mela, M., Silva De Assis, H.C., Pelletier, E., Randi, M.A.F., Oliveira Ribeiro, C.A., 2007. Enzymatic inhibition and morphological changes in *Hoplias malabaricus* from dietary exposure to lead (II) or methylmercury. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 67, 82-88.
- Beutler, E., 1975. **Red Cell Metabolism: A manual of biochemical methods**. New York: Grune&Straton.
- Beutler, E., Durom, O., Kelly, B.M., 1963. Improved method for the determination of blood glutathione. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, 61, 882-890.
- Binelli, A., Cogni, D., Parolini, M., Riva, C., Provini, A., 2009. Cytotoxic and genotoxic effects of in vitro exposure to Triclosan and Trimethoprim on zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) hemocytes. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, 150, 50–56.
- Binelli, A., Parolini, M., Pedriali, A., Provini, A., 2011. Antioxidant activity in the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) in response to triclosan exposure. **Water Air Soil Pollution**, 217, 421–430.
- Bonga, S.E.W., 2011. Hormonal responses to stress. In: Farrel, A.P. **Encyclopedia of fish physiology: from genome to environmental**. Elsevier: London, 1515-1523.

Capítulo V

- Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, 72, 248-254.
- Camargo, M.P.M., Fernandes, M.N., Martinez, C.B.R., 2009. How aluminium exposure promotes osmoregulatory disturbances in the neotropical freshwater fish *Prochilus lineatus*. **Aquatic Toxicology**, 94, 40–46.
- Campanha, M.B., Awan, A.T., Sousa, D.N.R., Grosseli, G.M., Mozeto, A.A., Fadini, P.S.A., 2015. 3-year study on occurrence of emerging contaminants in an urban stream of São Paulo State of Southeast Brazil. **Environmental Science Pollutant Research**, 22, 7936–7947.
- Capkin, E., Ozcelep, T., Kayis, S., Altinok, I., 2017. Antimicrobial agents, triclosan, chloroxylenol, methylisothiazolinone and borax, used in cleaning had genotoxic and histopatologic effects on rainbow trout. **Chemosphere**, 182, 720-729.
- Carlberg, I., Mannervik, B., 1975. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. **The Journal of Biological Chemistry**, 260 (14), 5475 – 5480.
- Dann, A.B., Hontela, A., 2011. Triclosan: environmental exposure, toxicity and mechanisms of action. **Journal of Applied Toxicology**, 31, 285 – 311.
- Eggens, M.L., Galgani, F., Klungøyr, J., Everts, J., 1992. Hepatic EROD activity in dab, *Limanda limanda*, in the German Bight using an improved plate-reader method. **Marine Ecology Progress Series**, 91, 71-75.
- Escalada, M.G., Russel, A.D., Maillard, J.Y., Ochs, D., 2005. Triclosan-bacteria interactions: single or multiple target sites? **Letters in Applied Microbiology**, 41, 476-481.
- Escarrone, A.L.V., Caldas, S.S., Primel, E.G., Martins, S.E., Nery, L.E.M., 2016. Uptake, tissue distribution and depuration of triclosan in the guppy *Poecilia vivipara* acclimated to freshwater. **Science of the Total Environment**, 560–561, 218–224.
- Evans, D.H., Piermarini, P.M., Choe, K.P., 2005. The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. **Physiology Review**, 85, 97-177.
- Federici, G., Shaw, B.J., Handy, R.D., 2007. Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. **Aquatic Toxicology**, 84, 415–430.

Capítulo V

- Gagnon, M.M., Rawson, C.A., 2017. Bioindicator species for EROD activity measurements: A review with Australian fish as a case study. **Ecological Indicators**, 73, 166-180.
- Gao, Y., Ji, Y., Li, G., An, T., 2014. Mechanism, kinetics and toxicity assessment of OH-initiated transformation of triclosan in aquatic environments. **Water Research**, 49, 360-370.
- Gibbs, A., Somero, G.N., 1989. Pressure adaptation of Na⁺/K⁺-ATPase in gills of marine teleosts. **Journal of Experimental Biology**, 143, 475–492.
- Hermes-Lima, M., 2004. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radical. In: Storey, K. B. (ed.) **Functional metabolism: regulation and adaptation**. New York: John Wiley & Sons, Inc., 319 – 368.
- Hopkins, J., Tudhope, G.R., 1973. Glutathione peroxidase in human red cells in health and disease. **Journal of Haematology**, 25, 563-575.
- Hwang, P.P., Lin, L.Y., 2014. Gill ionic transport, acid-base regulation, and nitrogen excretion. In: Evans, D.H., Clairbone, J.B., Currie, S. **The physiology of fishes**. 4^a ed., CRC Press: Boca Raton, 206-233.
- Ishibashi, H., Matsumura, N., Hirano, M., Matsuoka, M., Shiratsuchi, H., Ishibashi, Y., Takao, Y., Arizono, K., 2004. Effects of triclosan on the early life stages and reproduction of medaka *Oryzias latipes* and induction of hepatic vitellogenin. **Aquatic Toxicology**, 67, 167-179.
- Jones, R.D., Jampani, H.B., Newman, J.L., and Lee, A.S., 2000. Triclosan: A Review of Effectiveness and Safety in Health Care Settings. **American Journal of Infection Control**, v. 28, p. 184—196.
- Keen, J.H., Habig, W.H., Jakobi, W.B., 1976. Mechanism for the several activities of the glutathione-S-transferases. **Journal of Biological Chemistry**, 251, 6183-6188.
- Kobayashi, H., Sugiyama, C., Morikawa, Y., Hayashi, M., Sofuni, T.A., 1995. Comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis. **MMS Communications**, 3, 103-115.
- Ku, P., Wu, X., Nie, X., Ou, R., Wang, L., Su, T., Li, Y., 2014. Effects of triclosan on the detoxification system in the yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*): Expressions of CYP and GST genes and corresponding enzyme activity in

Capítulo V

- phase I, II and antioxidant system. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, 166, 105–114.
- Lee, D.G., Chu, K.H., 2013. Effects of growth substrate on triclosan biodegradation potential of oxygenase-expressing bacteria. **Chemosphere**, 93, 1904-1911.
- Lesser, M. P., 2012. Oxidative stress in tropical marine ecosystems. In: Abele, D.; Vasquez-Medina, J. P.; Zenteno-Savín, T. **Oxidative Stress in Aquatic Ecosystems**. Wiley: Blackwell, 2012, 1, 9 – 19.
- Levine, R.L., Williams, J.A., Stadtman, E.P., Shacter, E., 1994. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. **Methods Enzymology**, 233, 346–357.
- Liang, X.; Nie, X.; Ying, G.; An, T.; Li, K., 2013. Assessment of toxic effects of triclosan on the swordtail fish (*Xiphophorus helleri*) by a multi-biomarker approach. **Chemosphere**, 90, 1281–1288.
- Lin, D., Zhou, Q., Xie, X., Liu, Y., 2010. Potential biochemical and genetic toxicity of triclosan as an emerging pollutant on earthworms (*Eisenia fetida*). **Chemosphere**, 81, 1328–1333.
- Lindström, A., Buerge, I. M., Poiger, T., Bergqvist, P., Muller, M.D., Buser, H. R., 2002. Occurrence and environmental behavior of the bactericide triclosan and its methyl derivative in surface waters and in wastewater. **Environmental Science Technology**, 36, 2322 - 2329.
- Luo, Y., Guo, W., Ngo, H.H., Nghiem, L.D., Hai, F.I., Zhang, J., Liang, S., Wang, X.C., 2014. A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. **Science of the Total Environment**, 473–474, 619–641.
- Matozzo, V., Formenti, A., Donadello, G., Marin, M.G., 2012. A multi-biomarker approach to assess effects of triclosan in the clam *Ruditapes philippinarum*. **Marine Environmental Research**, 74, 40-46.
- McCord, J.M., Fridovich, I., 1969. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). **Journal of Biological Chemistry**, 244, 6049 - 6055.
- McMurry, L.M., Oethinger, M., Levy, S.B., 1998. Triclosan targets lipid synthesis. **Nature**, v. 394, p. 531-532.
- Miranda, R.G., Grötzner, S.R., Voigt, C.L., Campos, S.X., Randi, M.A.F., Oliveira Ribeiro, C.A., Filipak Neto, F., 2016. Effects of realistic concentrations of TiO₂

Capítulo V

- and ZnO nanoparticles in *Prochilodus lineatus* juvenile fish. *Environmental Science Pollution Research International*, 23, 5179-5188.
- Modesto, K.A.; Martinez, C.B.R., 2010. Roundup® causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. **Chemosphere**, 78 (3), 294-299.
- Montagner, C.C., Jardim, W.F., Von Der Ohe, P.C., Umbuzeiro, G.A., 2014. Occurrence and potential risk of triclosan in freshwaters of São Paulo, Brazil—the need for regulatory actions. **Environmental Science Pollution Research**. 21, 1850–1858.
- Nassef, M.; Matsumoto, S.; Seki, M.; Khalil, F., Kang, I.J.; Shimasaki, Y.; Oshima, Y., Honjo, T., 2010. Acute effects of triclosan, diclofenac and carbamazepine on feeding performance of Japanese Medaka Fish (*Oryzias latipes*). **Chemosphere**, 80, 1095-1100.
- Navarro, C.D.C., Martinez, C.B.R., 2014. Effects of the surfactant polyoxyethylene amine (POEA) on genotoxic, biochemical and physiological parameters of freshwater teleost *Prochilodus lineatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology, part C**, 165, 83-90.
- Nikinmaa, M. Bioindicators and biomarkers. In: Nikinmaa, M. An introduction to aquatic **toxicology**. Nova Iorque: Elsevier, 2014. Cap 12, p. 147 – 154.
- Oliveira, R., Domingue, I., Grisolia, C.K., Soares, A.M.V.M., 2009. Effects of triclosan on zebrafish early-life stages and adults. **Environmental Science Pollution Research**, 16, 679-688.
- Orvos, D. R.; Versteeg, D. J.; Inauen, J.; Capdevielle, M.; Rothenstein, A.; Cunningham, V., 2002. Aquatic toxicity of triclosan. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 21 (7), 1338–1349.
- Palermo, F., Risso, W.E., Simonato, J.D., Martinez, C.B.R., 2015. Bioaccumulation of nickel and its biochemical and genotoxic effects on juveniles of the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 116, 19–28.
- Paulino, M. G., Sakuragui, M.M., Fernandes, M.N., 2012. Effects of atrazine on the gill cells and ionic balance in a neotropical fish, *Prochilodus lineatus*. **Chemosphere**, 86, 1 – 7.

Capítulo V

- Peng, Y., Luo, Y., Nie, X.P., Liao, W., Yang, Y.F., Ying, G.G., 2013. Toxic effects of triclosan on the detoxification system and breeding of *Daphnia magna*. **Ecotoxicology**, 22, 1348-1394.
- Pereira, L., Fernandes, M.N., Martinez, C.B.R., 2013. Hematological and biochemical alterations in the fish *Prochilodus lineatus* caused by the herbicide clomazone. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 36, 1-8.
- Petrovic, M., Gonzalez, S., Barcelo, D., 2003. Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water. **Trends in Analytical Chemistry**, 22 (10), 685-696.
- Ribeiro, A.M., Risso, W.E., Fernandes, M.N., Martinez, C.B.R., 2014. Lead accumulation and its effects on the branchial physiology of *Prochilodus lineatus*. **Fish Physiology Biochemical**, 40, 645-657.
- Rowett, C.J., Hutchinson, T.H., Comber, S.D.W., 2016. The impact of natural and anthropogenic dissolved organic carbon (DOC), and Ph on the toxicity of triclosan to the crustacean *Gammarus pulex* (L.). **Science of Total Environment**, 565, 222-231.
- Russel, A.D., 2004. Whither triclosan? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 53, 693-695.
- Santos, T.G., Martinez, C.B.R., 2012. Atrazine promotes biochemical changes and DNA damage in a Neotropical fish species. **Chemosphere**, 89, 1118–1125.
- Silva, A.O.F., Martinez, C.B.R., 2014. Acute effects of cadmium on osmoregulation of the freshwater teleost *Prochilodus lineatus*: Enzymes activity and plasma ions. **Aquatic Toxicology**, 156, 161–168.
- Simonato, J.D., Fernandes, M.N., Martinez, C.B.R., 2011. Gasoline effects on biotransformation and antioxidant defenses of the freshwater fish *Prochilodus lineatus*. **Ecotoxicology**, 20, 1400-1410.
- Simonato, J.D., Fernandes, M.N., Martinez, C.B.R., 2013. Physiological effects of gasoline on the freshwater fish *Prochilodus lineatus* (Characiformes: Prochilodontidae). **Neotropical Ichthyology**, 11(3), 683-691.
- Simonato, J.D., Guedes, C.L.B., Martinez, C.B.R., 2008. Biochemical, physiological, and histological changes in the Neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to diesel oil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 69, 112-120.
- Simonato, J.D., Mela, M., Doria, H.B., Guiloski, I.C., Randi, M.A.F., Carvalho, P.S.M., Meletti, P.C., Assis, H.C.S., Bianchini, A., 2016. Biomarkers of waterborne

Capítulo V

- copper exposure in the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Aquatic Toxicology**, 170, 31-41.
- Singer, H., Muller, S., Tixier, C., Pillonel, L., 2002. Triclosan: occurrence and fate of a widely used biocide in the aquatic environment: field measurements in wastewater treatment plants, surface waters, and lake sediments. **Environmental Science and Technology**, 36 (23), 4998-5004.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice R.R., Schneider E.L., 1988. A single technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, 175, 184-191.
- Stuart, M.; Lapworth, D.; Crane, E.; Hart, A., 2012. Review of risk from potential emerging contaminants in UK groundwater. **Science of the Total Environment**, 416, 1 – 21.
- USEPA. United States Environmental Protection Agency. Contaminants of Emerging Concern including Pharmaceuticals and Personal Care Products. Disponível em: <http://www.epa.gov>. acesso em: abril/2016.
- Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Scoullou, M., 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 64, 178 – 189.
- Van Der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 13, 57-149.
- Vanzella, T.P., Martinez, C.B.R., Cólus, I.M.S., 2007. Genotoxic and mutagenic effects of diesel oil water soluble fraction on a neotropical fish species. **Mutation Research**, 631, 36-43.
- Vitale, A.M., Monserrat, J.M., Castilho, P., Rodriguez, E.M., 1999. Inhibitory effects of cadmium on carbonic anhydrase activity and ionic regulation of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Grapsidae). **Comparative Biochemistry Physiology, part C**, 122, 121-129.
- Von der Ohe, P.C., Jansen, M.S., Slobodnik, J., Brack, W., 2012. Triclosan – the forgotten priority substance? **Environmental Science Pollution Research**, 19, 585–591.

Capítulo V

Yazdankhah, S.P., Scheie, A.A., Hoiby, E.A., Lunestad, B.T., Heir, E., Fotland, T.O., Naterstad, K., Kruse, H., 2006. Triclosan and antimicrobial resistance in bacteria: an overview. **Microbial Drug Resistance**, 12 (2), 83-90.

CAPÍTULO IV - CONCLUSÕES GERAIS

Com base nos dados obtidos, o peixe *P. lineatus* se demonstrou sensível aos contaminantes emergentes testados, apresentando maior susceptibilidade quando exposto a concentrações mais altas e durante um maior tempo (168 horas). Apesar de a cafeína e o triclosan serem encontrados com uma maior frequência em concentrações na faixa de ng.L^{-1} , as concentrações que provocaram alterações nos biomarcadores de *P. lineatus* já foram relatadas em estudos brasileiros. Também, os órgãos analisados foram muito coerentes na investigação da sensibilidade do peixe, já que o fígado é o principal órgão de detoxificação, o cérebro por ser um órgão alvo da cafeína e a brânquia por ser o órgão com maior contato com os contaminantes.

Por serem compostos orgânicos, esperava-se que os contaminantes escolhidos ativassem as enzimas de biotransformação dos peixes expostos, porém somente a cafeína aumentou a atividade da EROD no fígado. Uma das consequências das vias de biotransformação elevadas é a formação exacerbada de espécies reativas de oxigênio (ERO). Porém, como não foram observados danos oxidativos nos peixes expostos à cafeína e nem o aumento de GSH, não se pode afirmar que tenha ocorrido esse processo. Já o triclosan promoveu aumento de LPO, indicando a instalação de um estresse oxidativo. Entretanto, como não ocorreram outros danos oxidativos e também não houve alterações nos antioxidantes enzimáticos, existe a possibilidade de o próprio triclosan estar atuando nos danos lipídicos. Se for levado em consideração o modo de ação do triclosan, que é a inibição da síntese de lipídios, poderia ser explorada melhor esta influência do composto nos lipídios de *P. lineatus*.

O triclosan não alterou a atividade da AChE para *P. lineatus*, enquanto que a cafeína diminuiu a atividade da enzima no músculo. Porém, esta enzima pareceu não influenciar nas alterações comportamentais observadas durante os experimentos da cafeína, uma vez que as principais mudanças ocorreram em 24 horas, no qual não teve variação da AChE, podendo estas serem atribuídas aos efeitos da cafeína nos receptores de adenosina.

A análise dos parâmetros osmorregulatórios foi extremamente relevante neste trabalho, uma vez que são praticamente inexistentes estudos relacionando distúrbios osmorregulatórios a contaminantes emergentes. Mesmo que o triclosan não tenha alterado o equilíbrio osmótico de *P. lineatus*, o triclosan diminuiu a

Capítulo VI

atividade da HA, indicando que a presença deste contaminante na água pode desencadear uma perturbação no equilíbrio ácido-base do animal. A cafeína, por sua vez, ocasionou grandes alterações na captação de íons de *P. lineatus*, principalmente pelo fato de que esta substância já possui efeitos no transporte de Ca^{2+} em células de mamíferos e, com o presente trabalho, comprovou-se que também pode atuar na captação de Ca^{2+} desta espécie, o que indica que esta substância pode ocasionar efeitos adversos na regulação iônica de teleósteos dulcícolas, processo fundamental para a sobrevivência destes organismos.

Portanto, este trabalho vem contribuir para com o levantamento de dados sobre os efeitos de contaminantes emergentes em organismos aquáticos, considerando que, até o momento, são poucos estudos que explorem peixes da região Neotropical. Também, os resultados comprovaram que a cafeína e o triclosan, que são compostos utilizados diariamente, precisam ser regulamentados em leis ambientais, uma vez que a presença destes contaminantes promovem alterações significativas na homeostase de *P. lineatus*, e no caso do triclosan, ocasionando a morte de indivíduos.