



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Instituto de Biociência de Botucatu

JULIA CHAVES PEREIRA

**Efeitos da carbamazepina, contaminante de preocupação
emergente, sobre a morfofisiologia e comportamento de lambari
Astyanax lacustris, um teleósteo neotropical**

BOTUCATU

2024

JULIA CHAVES PEREIRA

Efeitos da carbamazepina, contaminante de preocupação emergente, sobre a morfofisiologia e comportamento de lambari *Astyanax lacustris*, um teleósteo neotropical

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Instituto de Biociências de
Botucatu para obtenção do título de
bacharel em ciências biológicas.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Percília Cardoso Giaquinto

BOTUCATU

2024

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Pereira, Julia Chaves.

Efeitos da carbamazepina, contaminante de preocupação emergente, sobre a morfofisiologia e comportamento de lambari *Astyanax lacustris*, um teleósteo neotropical / Julia Chaves Pereira. - Botucatu, 2024

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Botucatu

Orientador: Percilia Cardoso Giaquinto

Capes: 20700008

1. Carbamazepina. 2. Comportamento alimentar.
3. Poluentes ambientais. 4. Lambari (Peixe).

Palavras-chave: Carbamazepina; Comportamento alimentar; Contaminante; Lambari; Substância de alarme.

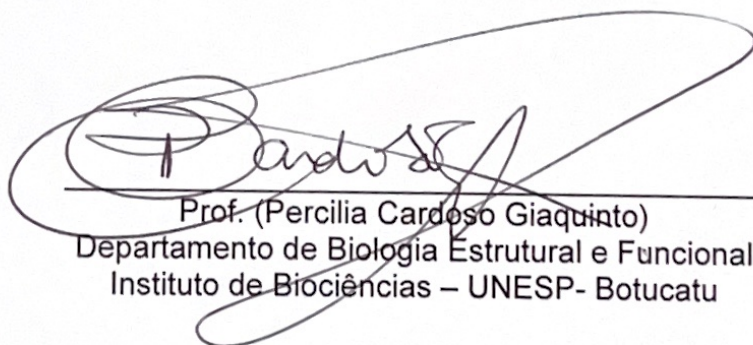
JULIA CHAVES PEREIRA

**Efeitos da carbamazepina, contaminante de preocupação
emergente, sobre a morfofisiologia e comportamento de lambari
Astyanax lacustris, um teleósteo neotropical**

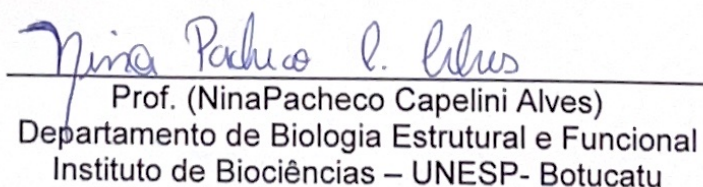
Trabalho de Conclusão de Curso,
apresentado a Universidade Estadual
Paulista, como parte das exigências para
a obtenção do título de Bacharel, do curso
de Graduação em Ciências Biológicas.

Botucatu, 22 de outubro de 2024

BANCA EXAMINADORA



Prof. (Percília Cardoso Giaquinto)
Departamento de Biologia Estrutural e Funcional
Instituto de Biociências – UNESP- Botucatu



Prof. (Nina Pacheco Capelini Alves)
Departamento de Biologia Estrutural e Funcional
Instituto de Biociências – UNESP- Botucatu

Agradecimentos

Agradeço profundamente a todos que fizeram parte da minha trajetória até o presente momento, especialmente aqueles que estiveram ao meu lado durante os sete anos de graduação. Nesse período, transformei completamente minha visão de mundo, desenvolvendo um pensamento crítico com o olhar de uma cientista. Ao entregar este documento, encerro minha jornada na graduação e tenho orgulho em dizer que sou professora e bióloga formada pela UNESP-Botucatu.

Em primeiro lugar, quero agradecer a todos os meus familiares, que estiveram presentes ao longo desse percurso, tanto no suporte financeiro quanto no apoio diário, permitindo que eu chegasse até aqui. Agradeço à minha mãe, Anne, que desde cedo me incentivou a ter um olhar curioso e que me inspira diariamente como mulher; ao meu pai, Edgar, que sempre me encorajou a estudar e a trabalhar com dedicação, entregando o meu melhor; ao meu irmão, Estevan, que sempre foi meu exemplo e referência, compartilhando interesses e confidências; e à minha cunhada, Amanda. Agradeço também aos meus avós, Ismael, Deny, Dirço e Alayde, que formaram as bases da nossa família.

Aos meus amigos, que hoje considero parte da minha família, Gabriela de Castro por estar presente em todos os momentos da minha graduação, Laura Leonel, Carolina Virginia e Maysa Santos por terem me acompanhado formando esse grupo inseparável, a Inara Alves por me apoiar e ouvir diariamente, a todas moradoras da República Sansão pelos incontáveis dias de risadas mas também por todas as nossas trocas, as minhas amigas desde a adolescência Gabrielle Lacerda e Úrsula Ávilla.

Agradeço a todos os colegas de laboratório que me auxiliaram durante os experimentos. Obrigada, João Favero, pelos conselhos e ensinamentos; Nina Pacheco, por me acompanhar no dia a dia; Gustavo Venâncio, por ser um amigo próximo e uma incrível referência acadêmica; Rafaella Cirilo e Gabriel Machert, por compartilharem as dificuldades da Iniciação Científica comigo. Agradeço, especialmente, à minha professora e orientadora, Percília Giaquinto, que me inspira e desafia de várias maneiras, como docente e mulher, além de ter me apoiado e confiado em mim ao longo deste processo. Agradeço também ao CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo apoio fornecido durante a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

Agradecimentos	1
1. Resumo	3
2. Abstract	3
3. Introdução	4
4. Materiais e Métodos	6
4.1. Animais e Aclimatação	6
4.2. Alimentação	6
4.3. Delineamento Experimental	7
4.4. Soluções e Concentrações da Carbamazepina	8
4.5. Substância de Alarme	8
5. Análise Estatística	8
6. Resultados	9
6.1. Ingestão Alimentar	9
6.2. Resposta a Substância de alarme	10
7. Discussão	13
7.1. Ingestão Alimentar	13
7.2. Resposta a Substância de Alarme	15
8. Conclusão	15
9. Referências	16

Efeitos da carbamazepina, contaminante de preocupação emergente, sobre a morfofisiologia e comportamento de lambari *Astyanax lacustris*, um teleósteo neotropical

Julia Chaves Pereira¹, Gustavo Venâncio da Silva², Nina Pacheco Capelini Alves¹, João Favero Neto¹, Percília Cardoso Giaquinto¹

1. Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, Instituto de Biociências/Universidade Estadual Paulista, Botucatu (SP,) Brasil
2. Departamento de Anestesiologia e Especialidades Cirúrgicas, Faculdade de Medicina de Botucatu/Universidade Estadual Paulista, Botucatu (SP,) Brasil

(A formatação deste documento está de acordo com a revista FEBS Open bio, adaptado ao português.)

1. Resumo

A carbamazepina (CBZ) é um fármaco anticonvulsivante frequentemente detectado como contaminante em águas superficiais, estações de tratamento de esgoto e água potável, gerando preocupação sobre os seus efeitos a longo prazo em espécies de peixes. Diante da falta de informações sobre os possíveis impactos da CBZ na morfofisiologia e comportamento de peixes, este estudo expôs exemplares de *Astyanax lacustris*, lambari, a duas concentrações de carbamazepina (500 ng/L e 1250 ng/L) por períodos de 7 e 15 dias. A taxa de ingestão diária de ração foi comparada entre os grupos tratados e um grupo controle. Ademais, avaliou-se também se a carbamazepina alteraria outras respostas fisiológicas do animal como o seu mecanismo anti-predatório, para isso analisamos se houve uma resposta à substância de alarme dos indivíduos tratados. Os resultados indicaram uma alteração significativa na taxa de ingestão de alimentos nos animais expostos à concentração mais elevada de CBZ (1250 ng/L). Portanto, esse estudo indica que a CBZ pode influenciar o comportamento alimentar do lambari.

Palavras-chave: Carbamazepina, contaminante, lambari, comportamento alimentar, substância de alarme.

2. Abstract

Carbamazepine (CBZ) is an anticonvulsant drug frequently detected as a contaminant in surface waters, wastewater treatment plants, and drinking water, raising concerns about its long-term effects on fish species. Given the lack of information on the potential impacts of CBZ on the morphophysiology and behavior of fish, this study exposed specimens of *Astyanax lacustris* (lambari) to two concentrations of carbamazepine (500 ng/L and 1250 ng/L) for periods of 7 and 15 days. The daily feed intake rate was compared between treated groups and a control group. Furthermore, the study assessed whether carbamazepine would alter other physiological responses of the fish, such as its anti-predator mechanism, by analyzing the response to alarm substance of the treated individuals. The results indicated a significant alteration in the daily feed intake rate of animals exposed to the higher concentration of CBZ (1250 ng/L). Therefore, this study suggests that CBZ can influence the feeding behavior of lambari.

Keywords: Carbamazepine, contaminant, lambari, feeding behavior, alarm substance

3. Introdução

Nos últimos anos os produtos de cuidados pessoais e farmacêuticos se tornaram alvo de diversas pesquisas por serem contaminantes emergentes, ameaçando a saúde humana e também o ecossistema aquático [1]. Esses produtos podem ser diversos, desde medicamentos humanos e veterinários incluindo antibióticos, beta reguladores, reguladores lipídicos, meios de contraste de raio-x, anticonvulsivantes, dentre outros [2]. Os efeitos desses contaminantes em peixes podem ser diversas alterações de diferentes níveis biológicos, como modificações em tecidos, disfunções fisiológicas e mudanças comportamentais, o que prejudica o crescimento, reprodução e muitas vezes a sobrevivência desses animais [3].

Alguns desses fármacos exigem um consumo diário no tratamento do indivíduo, como é o caso da carbamazepina (CBZ), um medicamento antiepilético [4], cujo resíduo é frequentemente encontrado em estações de tratamentos de esgoto (ETE) e seus efluentes e também na superfície de corpos d'água. Essa substância possui uma baixa degradação nos processos convencionais de tratamento de esgoto [5], e seu uso global estimado chega a 1014 toneladas por ano [6]. A carbamazepina foi detectada em concentrações variando entre 230 a

1090 ng/L em rios na China [7] e também em água potável em outros países, registrando concentrações de até 258 ng/L na Alemanha [6], ela é constantemente detectada juntamente com outros fármacos e substâncias como fluoxetina, clonazepam, ibuprofeno e cafeína [5]. Em um estudo realizado no Brasil, a CBZ foi o segundo fármaco mais registrado em coletas na Estação de Tratamento de Água (ETA) de Jaboticabal- SP [5].

Nosso país está localizado dentro da região neotropical e nela está registrada a maior diversidade de peixes de água doce do mundo, que tem como principais ordens os *Characiformes* e *Siluriformes*. Dentro da ordem dos *Characiformes* a família com maior representatividade é a *Characidae* com mais de 1192 espécies, que são em sua maioria peixes de médio e pequeno porte [8]. Os gêneros *Astyanax*, *Moenkhausia* e *Hemigrammus* representam 35% das espécies de *Characidae*, e são compostos por 160 espécies descritas [9], essa família possui uma distribuição ampla por todo continente americano.

O *Astyanax lacustris*, popularmente conhecido como lambari, é uma espécie pequena, onívora e oportunista, extremamente aceita dentro da aquicultura, usada para alimentação humana e na pesca, como isca viva [8]. Ela pode viver em ambientes com baixa qualidade de água e alta densidade populacional, e por isso vem sendo utilizada em estudos como bioindicador [3] e aplicados à aquicultura.

Dentro da piscicultura a alimentação é um importante parâmetro para análise comportamental das espécies aquáticas, o comportamento dos peixes durante sua alimentação é o melhor indicador para monitorar sua saúde, visto que se um indivíduo está sendo manuseado de forma adequada sua tendência é se alimentar de maneira imediata ao oferecimento do alimento, comendo ativamente até alcançar a saciedade [10]. Além da alimentação, o comportamento anti-predatório foi descrito como um importante parâmetro para a avaliação de saúde e bem-estar nos teleósteos.

A comunicação nos sistemas aquáticos está diretamente relacionada com o ambiente no qual estão inseridos, a água, e por isso essas espécies possuem diferentes estímulos sensoriais externos que são reconhecidos por seus órgãos dos sentidos, eles podem ser estímulos visuais, elétricos ou químicos [11]. Os sinais químicos são uma importante fonte de informações para os peixes, uma vez que a água dispersa rapidamente pistas ali presentes [12] e por isso a substância de alarme é o principal meio para análise do comportamento anti-predatório em

teleósteos. A substância de alarme (SA) fica localizada na epiderme dentro de células especializadas chamadas células club, e só é liberada quando ocorrem danos mecânicos na pele, que ocorreriam num evento de predação ao animal [13].

Diante deste contexto, o presente estudo teve como objetivo investigar os efeitos da carbamazepina em organismos aquáticos, utilizando diferentes concentrações do fármaco em condições controladas de laboratório, concentrações estas similares encontradas no ambiente. A relevância deste estudo está na crescente presença de fármacos contaminantes no meio aquático e na necessidade de entender seus impactos morfológicos, comportamentais e fisiológicos, a longo prazo nos organismos aquáticos, especificamente em peixes. Espera-se que os resultados deste projeto contribuam para o desenvolvimento de estratégias eficazes de gestão ambiental, tratamento de efluentes e conservação de espécies.

4. Materiais e Métodos

4.1. Animais e Aclimação

Os animais utilizados foram machos adultos de lambari, *Astyanax lacustris*, adquiridos a partir da piscicultura comercial, sendo o N=60. Os peixes foram mantidos em biotério para aclimação, para tanto foi utilizado um tanque coletivo com densidade aproximada de 3 animais por litro, com temperatura média de 27°C, ciclo dia e noite de 12 horas cada, com os parâmetros de pH, amônia e nitrito ideais para a espécie, durante um período de 7 dias. Em seguida foram isolados em aquários de 20L, por 7 dias, até o início da administração do fármaco na água dos aquários individuais. Os procedimentos do presente estudo tiveram aprovação do Comitê de Ética do IBB.

4.2. Alimentação

Durante o experimento os animais foram alimentados com ração comercial (35% de proteína), com pellets de 0,8mm, a quantidade de ração oferecida era de 3% (0,066g) da média do peso corporal inicial dos animais (2,62g). Após individualizados, cada animal recebia 54 pellets de ração diariamente, dividido em três refeições (18 pellets por refeição), e, depois de oferecida a ração, eram contabilizados a latência alimentar e a quantidade de pellets ingerida para analisar o

comportamento alimentar dos peixes submetidos a diferentes concentrações de CBZ. .

4.3. Delineamento Experimental

O delineamento experimental se deu a partir da administração da CBZ na água e os animais foram divididos em três grupos, com n=20 por grupo, um controle (T0) e dois tratamentos (T1 e T2). Metade dos animais foram expostos durante o período inicial de 7 dias e o restante por 15 dias. Os parâmetros do comportamento alimentar foram analisados diariamente, e a resposta à substância de alarme (descrição a seguir) foi analisada por meio de filmagens no 8º e 16º de exposição de cada grupo. Após a exposição dos animais à substância de alarme, metade dos animais foram eutanasiados por imersão em óleo de cravo 0,04% [14].

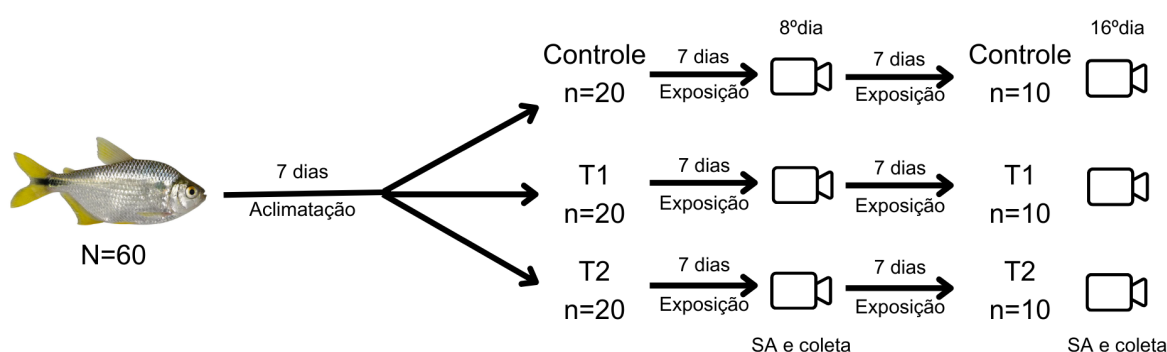


Figura 1. Esquematização do delineamento experimental. **Fonte:** Elaborado pela autora.

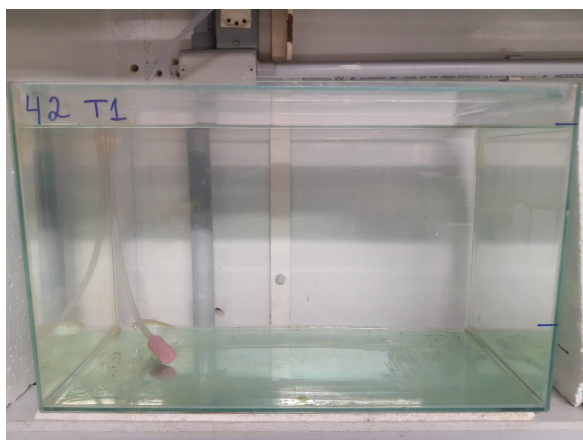


Figura 2 e 3. Imagem da disposição da sala de experimentos e aquários que continham um sistema de aeração via pedra porosa e barreiras físicas de isopor para impedir a visualização de coespecíficos. **Fonte:** Elaborado pela autora.

4.4. Soluções e Concentrações da Carbamazepina

A carbamazepina foi diluída em Dimetilsulfóxido (DMSO), utilizado como substância veículo, na concentração de 25 mg/L. A substância foi mantida em local refrigerado, com temperatura média aproximada de 2,5°C, em vidro âmbar fechado para evitar degradação por exposição à luz. As concentrações utilizadas em cada grupo experimental foram 500 ng/L (0,4 mL de CBZ a 25 mg/L) como tratamento 1 e 1250 ng/L (1 mL de CBZ a 25 mg/L) como tratamento 2, e tendo o controle recebido apenas doses de DMSO nas mesmas concentrações do tratamento 2. Para manter as concentrações e evitar uma possível degradação do fármaco, foram realizadas trocas de água e reposição do fármaco a cada dois dias. Durante as reposições, 70% da água (14 L) era removida e 30% (6 L) era mantida.

As dosagens de CBZ eram ajustadas com base na quantidade de água adicionada ao aquário. Portanto, a cada troca, eram adicionados 0,28 mL (para a concentração de 500 ng/L) e 0,7 mL (para a concentração de 1250 ng/L) de CBZ a 25 mg/L. As concentrações foram escolhidas baseadas no intervalo de concentrações registrado em outros estudos, 230 a 1090 ng/L [7].

4.5. Substância de Alarme

O extrato da substância de alarme (SA) foi coletado através de adaptações do método de filetagem [15] no qual três indivíduos doadores foram eutanasiados por ruptura na medula espinhal, sem a utilização de anestésicos para evitar interferência química [11]. Na sequência foram realizados cortes transversais com um bisturi, em ambos os lados do tronco do animal e os cortes foram lavados em 50mL de água destilada [15], para cada indivíduo doador, e diluído em mais 50 mL totalizando 300 ml, e por fim filtrado, para serem removidos resquícios de tecidos. Cada animal experimental foi exposto a 10ml de extrato de SA, com o auxílio de seringas e mangueiras, que possibilitaram uma aplicação na distância de 1m dos animais para que não houvesse interferências no seu comportamento. As gravações foram realizadas 5 minutos antes da aplicação, para a determinação do padrão inicial e 10 minutos após a aplicação como teste. As análises foram feitas através do software de rastreamento de animais *Zebtrack*, desenvolvido no *Matlab*.

5. Análise Estatística

Os dados foram analisados quanto à normalidade usando histogramas e o teste Shapiro-Wilk. A porcentagem de pellets ingeridos e as respostas do teste à substância de alarme (velocidade média, velocidade máxima, distância total e freezing) foram todas consideradas não-paramétricas. Sendo assim, os dados foram analisados seguindo uma Análise de Variância (ANOVA) com transformação de ranques alinhados (Aligned Rank Transformation), uma alternativa não-paramétrica da ANOVA tradicional. Para a avaliação de ingestão alimentar, o tratamento (Controle, CBZ 500ng/L e CBZ 1250ng/L) foi considerado um fator fixo e o tempo (dias de exposição) foi usado como medida repetida. Para o teste de substância de alarme, foram considerados fatores fixos o tratamento (Controle, CBZ 500ng/L e CBZ 1250ng/L), a exposição à substância de alarme (antes ou depois) e o tempo de exposição ao tratamento (8 dias ou 16 dias). Em ambos os casos, o pós-teste de comparações múltiplas usando o ajuste de Bonferroni foi utilizado. Todos os testes foram realizados com nível de significância de 5%.

6. Resultados

6.1. Ingestão Alimentar

Houve uma interação entre o tratamento e o tempo de exposição ($F(28, 582) = 1,71$, $p = 0,01$; Figura 1). O grupo CBZ 1250ng/L teve menor ingestão alimentar em relação ao grupo Controle nos dias 1 a 4 e 6, e maior ingestão alimentar no dia 5. Nos demais dias não houveram diferenças significativas entre os grupos. O grupo CBZ 500ng/L não apresentou diferenças em relação ao grupo Controle ou ao grupo CBZ 1250ng/L.

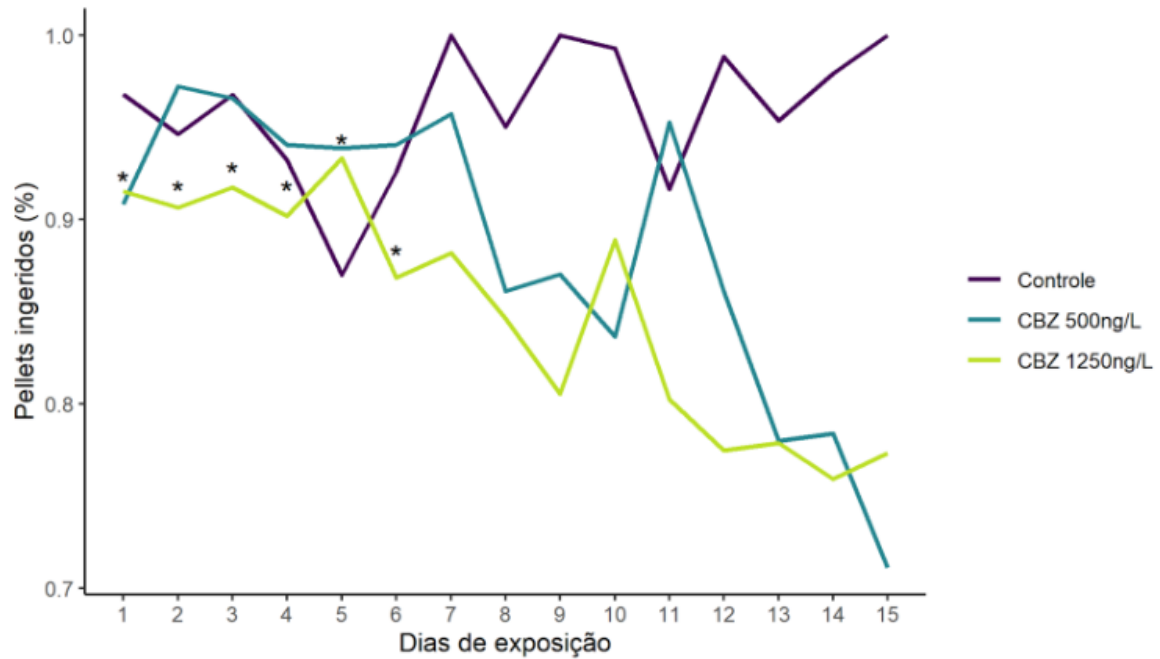


Figura 4. Ingestão alimentar média ao longo dos dias de exposição ao tratamento. *p < 0,05. **Fonte:** Elaborado pela autora.

6.2. Resposta a Substância de alarme

Não houveram diferenças significativas em relação à velocidade média percorrida pelo animal. Na velocidade máxima, houve um efeito significativo de exposição à substância de alarme ($F(1, 153) = 6,37$, $p = 0,01$) e de tempo de exposição ao tratamento ($F(1, 153) = 9,72$, $p = 0,002$; Figura 1A), no qual foi observado maior velocidade máxima após exposição à substância de alarme e em animais que foram tratados por 16 dias. Na distância total percorrida, houve um efeito significativo de exposição à substância de alarme ($F(1, 153) = 28,65$, $p = 3,11 \times 10^{-7}$; Figura 1B), no qual foi observado maior distância percorrida pelos animais após exposição à substância de alarme. No tempo de *freezing*, houve um efeito significativo de exposição à substância de alarme ($F(1, 153) = 19,75$, $p = 1,69 \times 10^{-5}$; Figura 1C), no qual foi observado que os animais passaram mais tempo no comportamento de *freezing* após a exposição à substância de alarme.

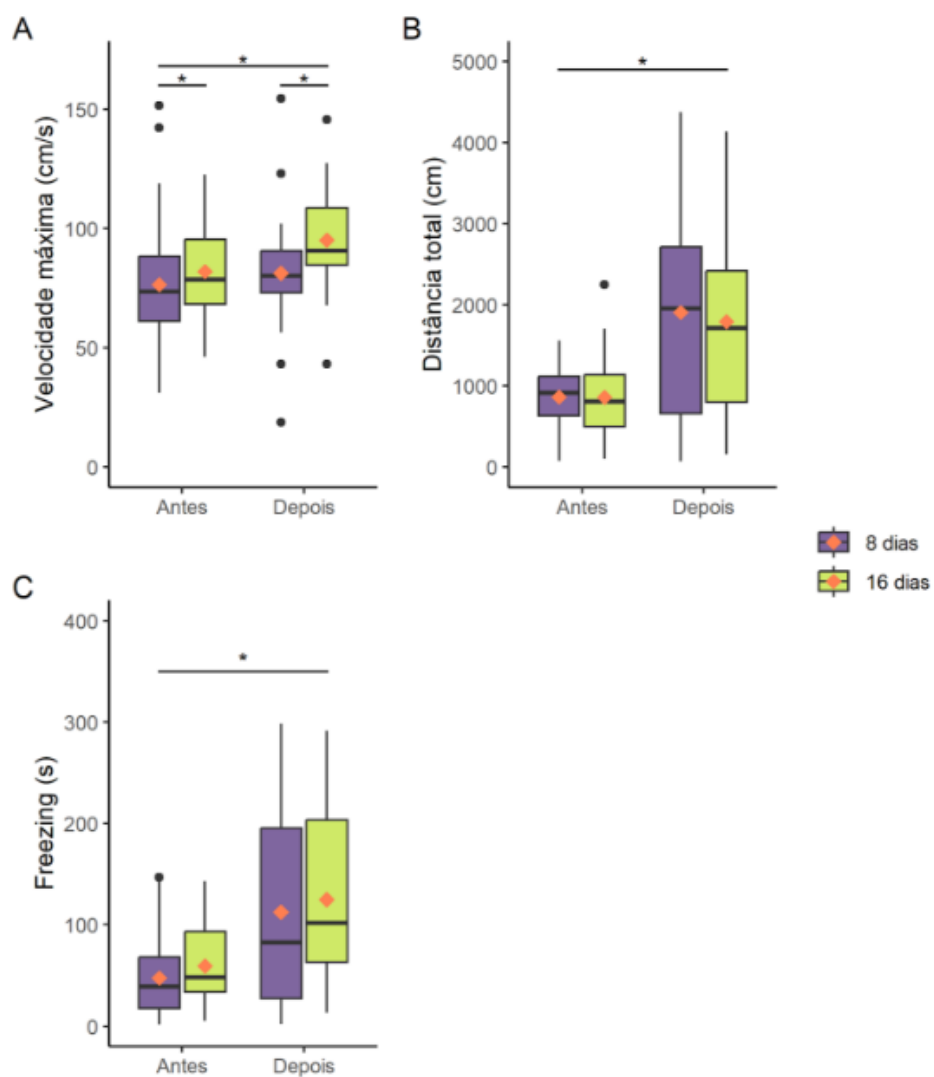
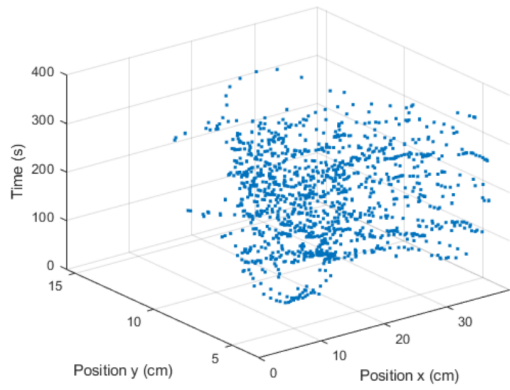


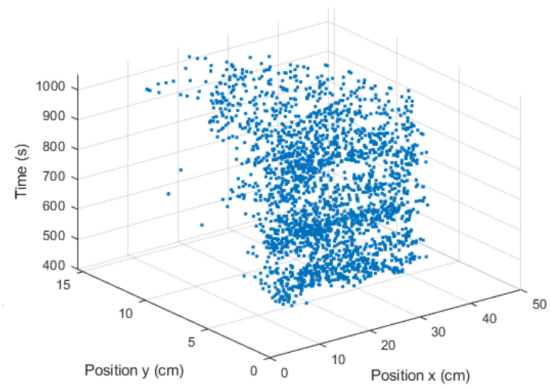
Figura 5. Efeito do tempo de tratamento e da exposição à substância de alarme sobre (A) Velocidade máxima (cm/s), (B) Distância total (cm) e (C) *Freezing* (s). O losango laranja representa a média. * $p < 0,05$. **Fonte:** Elaborado pela autora.

Controle

Antes

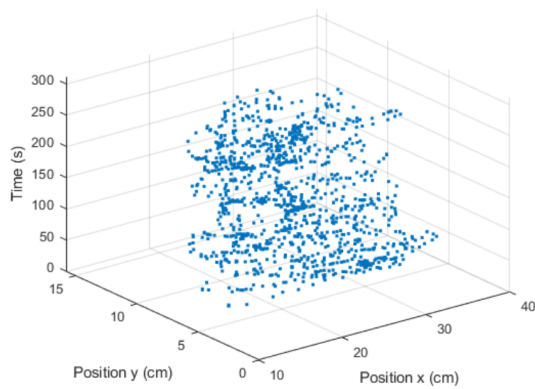


Depois

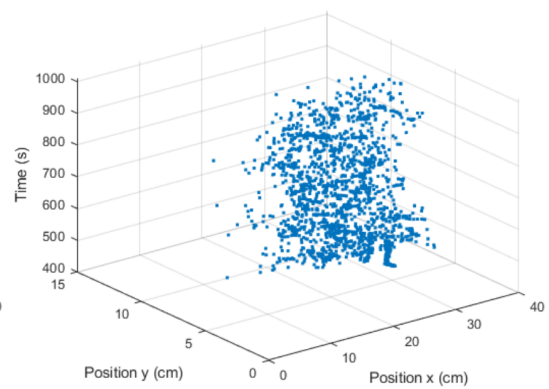


CBZ 500ng/L

Antes



Depois



CBZ 1250ng/L

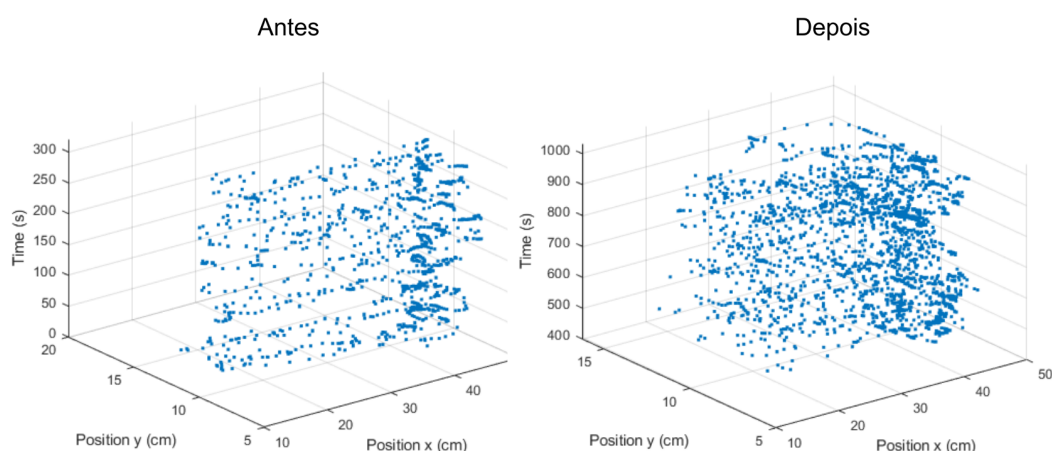


Figura 6 a 8. Gráficos 3D Plot dos grupos Controle, CBZ 500ng/L e CBZ 1250ng/L antes e depois da administração da substância de alarme. **Fonte:** Gerado pelo Zebtrack.

7. Discussão

7.1. Ingestão Alimentar

No presente estudo foi demonstrado que a administração de carbamazepina interferiu na ingestão alimentar no grupo tratado (CBZ 1250ng/L). No decorrer do tempo de experimento pode-se notar pelo gráfico de ingestão diária, uma diminuição geral de ingestão dos grupos tratados, se comparado com os dias iniciais de exposição, porém não houve uma diferença significativa e seriam necessários mais dias de exposição a CBZ, para registro de outras alterações no comportamento alimentar cronicamente.

Em outros estudos, foi registrado que a carbamazepina apresenta uma toxicidade crônica para algumas espécies aquáticas de rotíferos e braquiópodes e zebrafish em estado larval, em concentrações respectivamente de 25 g/L, 377 g/L e 25 mg/L [17], entretanto essas dosagens são muito maiores do que as encontradas no ambiente que variam de 200 ng/L a 1000 ng/L [7]. Apesar das dosagens maiores, nesse mesmo estudo o tempo de exposição era menor, variando entre 2 a 10 dias [18], o que corrobora para a hipótese de que a exposição crônica a CBZ poderia

afetar ainda mais os peixes e talvez potencializar a sua morte por subnutrição ou doenças.

Em ratos, a CBZ é considerada carcinogênica [19] e sua dose letal para roedores é de 670 mg/kg [20], mas não foram registrados efeitos adversos envolvendo a alimentação. Em humanos a carbamazepina possui um tempo de meia vida que varia, dependendo da dose e frequência utilizada, decrescendo a absorção de 50 horas/200mg para 28 horas se utilizada em uma terapia de 900mg [21]. Seus efeitos colaterais podem ser diversos como a visão turva, sonolência, tontura, náuseas, vômitos, e efeitos mais graves como morte por anemia aplástica, problemas cardiovasculares, dentre outros [17]. Não haviam sido registrados ainda em outras espécies, e também em peixes, uma interferência na alimentação por consequência de exposição à carbamazepina.

As grandes variações de ingestão registradas no grupo controle podem estar relacionadas com as trocas intensas de água para a reaplicação da substância veículo, uma vez que a recomendação diária de troca parcial de água é de 30% [22], e durante o estudo as trocas eram de 70%, sendo considerada uma troca brusca, que pode acarretar no desenvolvimento de doenças nos animais por ser um agente estressor [23, 24]. Essa variação também é perceptível nos resultados, dada a mudança de ingestão em um dia, com ou sem a reposição de água. Alguns dos fatores que podem influenciar na alteração do comportamento alimentar de peixes são temperatura, tamanho dos animais e a qualidade da água (poluentes e quantidade de oxigênio dissolvido) [25]. Portanto, é necessário reavaliar o manejo de troca e reposição do fármaco, uma vez a CBZ é comumente encontrada em estações de tratamentos de esgoto (ETE) e seus efluentes, e em águas superficiais de corpos d'água [5, 6], sua degradação não ocorre tão rapidamente em ambientes controlados, como foi assumido durante o delineamento experimental. Portanto, não seria necessária a troca parcial de água e reposição da carbamazepina a cada dois dias como foi realizado no estudo.

Além disso, para futuras aplicações e novos estudos é importante destacar o potencial adaptativo das espécies do gênero *Astyanax* a locais expostos à poluição antropogênica, uma vez que esses animais possuem uma alta tolerância à degradação ambiental [26], e portanto se expostos a CBZ por um período maior que o do presente projeto, os animais poderiam se adaptar diminuindo os efeitos observados nos resultados.

Portanto, os dados coletados corroboram para a hipótese de que a carbamazepina tem influência sobre a ingestão alimentar do animal, reduzindo-a, porém são necessários estudos mais aprofundados com maior duração e diferentes concentrações para avaliar a toxicidade crônica da CBZ e sua influência em outros parâmetros comportamentais que podem comprometer a vida do peixe.

7.2. Resposta a Substância de Alarme

Os resultados do teste de resposta a substância de alarme demonstraram que a mesma foi extraída de maneira correta e teve os efeitos descritos esperados nos peixes, que são a natação rápida e desordenada, diminuição da atividade de natação ou *freezing*, e fuga rápida do local no qual a substância foi detectada [27]. Uma vez que houveram diferenças significativas nos parâmetros analisados pelo programa *Zebtrack* (Velocidade Máxima, Distância Total Percorrida e Freezing) em todos os grupos, antes e depois da exposição SA.

Foi observada também uma diferença significativa na velocidade máxima entre o grupo exposto a 8 e 16 dias, sendo que os de 16 dias tiveram uma velocidade máxima maior do que os de 8 dias de exposição. Isso pode levar a interpretação de que o tempo do experimento teve um efeito maior do que a exposição a carbamazepina, já que não houveram diferenças entre os grupos, controle e tratamentos.

Portanto, analisando os resultados, descarta-se a hipótese de que a carbamazepina tem influência no mecanismo anti-predatório do lambari, mas podemos inferir que o método de preparo do extrato [15], é compatível com a espécie e ela pode ser utilizada como modelo para essa resposta. O lambari não havia sido descrito na literatura como espécie responsiva à substância de alarme, então o presente estudo foi crucial para essa descoberta.

8. Conclusão

A espécie alvo do estudo, *Astyanax lacustris*, é altamente adaptável e sua taxa de sobrevivência é alta em águas de baixa qualidade [26], neste sentido, podemos considerar que, com a exposição prolongada, a espécie poderia se adaptar às condições do experimento. O manejo se demonstrou como um agente de grande influência no comportamento dos animais, independente do grupo, já que

nos últimos dias de experimento os peixes aparentavam estar estressados e, de acordo com as análises, mais reativos à substância de alarme.

As concentrações de carbamazepina utilizadas foram baseadas nas encontradas no ambiente [7], e em sua maioria os contaminantes emergentes são identificados em pequenas dimensões de concentrações como mg/L, µg/L e ng/L [28, 29]. Devemos considerar também que esses fármacos não são encontrados de maneira isolada em condições reais, e que podem acontecer interações entre uma substância e outra [30], potencializando os efeitos tóxicos nos peixes. Em humanos, por exemplo, quando a CBZse combina com outros fármacos pode causar efeitos colaterais [31]. Portanto, a carbamazepina administrada de maneira isolada não se demonstrou um agente ativo para alterar significativamente o mecanismo anti-predatório dos animais, demonstrado através da resposta à substância de alarme, mas alterou significativamente o comportamento alimentar da espécie. São necessários estudos mais aprofundados com a interação de outros fármacos e contaminantes emergentes na água, além de um manejo diferente dos peixes, considerando também realizar uma análise de água para verificar se há ou não a degradação da carbamazepina. Também, variar as concentrações e o tempo de exposição no delineamento experimental.

9. Referências

- [1] Wu, J., Shi, D., Wang, S., Yang, X., Zhang, H., Zhang, T., Zheng, L., & Zhang, Y. (2022). Derivation of water quality criteria for carbamazepine and ecological risk assessment in the Nansi Lake Basin. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19, 10875.
- [2] Liu, N., Jin, X., Feng, C., Wang, Z., Wu, F., Johnson, A. C., & Giesy, J. P. (2020). Ecological risk assessment of fifty pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in Chinese surface waters: A proposed multiple-level system. *Environment International*, 136, 105454.
- [3] Nunes, M. E. M. (2013). *Utilização de peixes do gênero Astyanax sp como bioindicadores de contaminação ambiental no Rio Santa Maria, Rosário do Sul-RS* [Tese de mestrado]. Universidade Federal de Santa Maria.

- [4] Andreozzi, R., Marotta, R., Pinto, G., & Pollio, A. (2002). Carbamazepine in water: Persistence in the environment, ozonation treatment and preliminary assessment on algal toxicity. *Water Research*, 36(11), 2869–2877.
- [5] Carvalho, A. C. C. de. (2021). *A presença de fármacos e cafeína em água superficial e destinada ao consumo humano* [Tese de doutorado]. Universidade de São Paulo.
- [6] Han, Y., Ma, M., Oda, Y., Rao, K., Wang, Z., Yang, R., & Liu, Y. (2019). Insight into the generation of toxic products during chloramination of carbamazepine: Kinetics, transformation pathway and toxicity. *Science of The Total Environment*.
- [7] Chen, H., Zha, J., Liang, X., Li, J., & Wang, Z. (2014). Effects of the human antiepileptic drug carbamazepine on the behavior, biomarkers, and heat shock proteins in the Asian clam *Corbicula fluminea*. *Aquatic Toxicology*, 155, 1–8.
- [8] Santos, J. A., Soares, C. M., & Bialetzki, A. (2020). Early ontogeny of yellowtail tetra fish *Astyanax lacustris* (Characiformes: Characidae). *Aquaculture Research*, 51, 4030–4042.
- [9] Carvalho, F. R., Sarmento-Soares, L. M., & Martins-Pinheiro, R. F. (2014). Redescription of *Moenkhausia doceana* (Steindachner, 1877) (Ostariophysi: Characiformes): A characid from the Northeastern Mata Atlântica ecoregion, Brazil. *Neotropical Ichthyology*, 12(2), 377–388.
- [10] Masser, M. P. (1997). *Cage culture. Handling and feeding caged fish*. Southern Regional Aquaculture Center (SRAC). Auburn University.
- [11] Sanches, F. H. C. (2013). *Resposta de estresse à substância de alarme na tilápia-do-Nilo* [Trabalho de conclusão de curso, Universidade Estadual Paulista (UNESP)].
- [12] Giaquinto, P. C., & Volpato, G. L. (2001). Hunger suppresses the onset and the freezing component of the antipredator response to conspecific skin extract in pintado catfish. *Behaviour*, 138, 1205–1214.

- [13] Brown, G. E., et al. (2004). Production of chemical alarm cues in convict cichlids: The effects of diet, body condition and ontogeny. *Annales Zoologici Fennici*, 41(3), 487–499.
- [14] Fernandes, I. M., Bastos, Y. F., Barreto, D. S., Lourenço, L. S., & Penha, J. M. (2017). The efficacy of clove oil as an anaesthetic and in euthanasia procedure for small-sized tropical fishes. *Brazilian Journal of Biology*, 77(3), 444–450.
- [15] Foam, P. E., Mirza, R. S., Chivers, D. P., & Brown, G. E. (2005). Juvenile convict cichlids (*Archocentrus nigrofasciatus*) allocate foraging and antipredator behaviour in response to temporal variation in predation risk. *Behaviour*, 142, 129–144.
- [16] Ventura Fernandes, B. H., et al. (2022). Toxicity of spike fragments SARS-CoV-2 S protein for zebrafish: A tool to study its hazardous for human health? *Science of The Total Environment*, 813, 152345. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152345>
- [17] de Oliveira Martins, A. C. (2009). *Processo oxidativo avançado UV/H₂O₂ na oxidação da carbamazepina: Avaliação por ensaios respirométricos e ecotoxicológicos* [Tese de doutorado].
- [18] Ferrari, B., Paxeus, N., Giudice, R., Pollio, A., & Garric, J. (2003). Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters: Study of carbamazepine, clofibric acid, and diclofenac. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 55, 359–370.
- [19] Fent, K., Weston, A. A., & Caminada, D. (2006). Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology*, 76, 122–159.
- [20] Budavari, S. (Ed.). (1996). *The Merck index: An encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals* (12th ed.). Merck and Co.
- [21] Gilman, A. G., Rall, T. W., Nies, A. S., & Taylor, P. (Eds.). (1990). *Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics* (8th ed.). Pergamon Press.
- [22] Santos, L. R. B. dos, & Oba, E. T. (2009). Dieta: Ferramenta importante para manejo dos peixes no cultivo. In M. Tavares-Dias (Ed.), *Manejo e sanidade de peixes em cultivo* (Cap. 5). Embrapa Amapá.

- [23] Paixão, L. F., Santos, R. F. B., Ramos, F. M., & Fujimoto, R. Y. (2013). Efeitos do tratamento com formalina e sulfato de cobre sobre os parâmetros hematológicos e parasitos monogenéticos em juvenis de *Hemigrammus* sp. (Osteichthyes: Characidae). *Acta Amazonica*, 43, 211–216.
- [24] Sá, M. (2023). *Limnocultura: Limnologia para aquicultura*. Blucher.
- [25] Oba, E. T., Mariano, W. S., & Santos, L. R. B. dos. (2009). Estresse em peixes cultivados: Agravantes e atenuantes para o manejo rentável. In M. Tavares-Dias (Org.), *Manejo e sanidade de peixes em cultivo* (Cap. 8). Embrapa Amapá.
- [26] Prado, P. S. (2010). *Avaliação da atividade reprodutiva e de biomarcadores de impacto ambiental no lambari *Astyanax fasciatus* do reservatório de Furnas, Rio Grande, Minas Gerais* [Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Lavras].
- [27] Chivers, D. P., & Smith, R. J. F. (1998). Chemical alarm signalling in aquatic predator-prey systems: A review and prospectus. *Écoscience*, 5(3), 338–352.
- [28] Jones, O. A., Lester, J. N., & Voulvoulis, N. (2005). Pharmaceuticals: A threat to drinking water? *Trends in Biotechnology*, 23(4), 163–167.
- [29] Luo, Y., et al. (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.
- [30] Prado, M. R. d. S. (2018). *Avaliação dos efeitos deletérios de fármacos psicotrópicos sobre o desenvolvimento dos estágios embrio-larvais de zebrafish* [Tese de doutorado, Universidade Federal de São Paulo].
- [31] Downey, P., Fajuri, A., & Valdés, G. (2001). Refractory arterial hypertension and the use of anticonvulsant drugs: Case report. *Revista Médica de Chile*, 129(11), 1325