UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

PAULA PINHEIRO TEIXEIRA

PSICOFÁRMACOS EM CONCENTRAÇÕES AMBIENTALMENTE RELEVANTES INDUZEM ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS EM PEIXES-ZEBRA (*Danio rerio*)

UBERABA
2026

Paula Pinheiro Teixeira

Psicofármacos em concentrações ambientalmente relevantes induzem alterações comportamentais em peixes-zebra (*Danio rerio*)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.
Orientador: Prof. Dr. Matheus Marcon

Uberaba
2026

Catalogação na fonte: Biblioteca da Universidade Federal do Triângulo Mineiro

T268p

Teixeira, Paula Pinheiro
Psicofármacos em concentrações ambientalmente relevantes induzem alterações comportamentais em peixes-zebra (*Danio rerio*) / Paula Pinheiro Teixeira. -- 2026.
52 f. : il., tab., graf.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) -- Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2026
Orientadora: Prof. Dr. Matheus Marcon

1. Poluição da Água. 2. Psicotrópicos. 3. Peixe-Zebra. I. Marcon, Matheus. II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III.Título.

CDU 628.193:615.214

Amanda Franzão R. Silva - Bibliotecária CRB-6/3461

PAULA PINHEIRO TEIXEIRA

PSICOFÁRMACOS EM CONCENTRAÇÕES AMBIENTALMENTE RELEVANTES INDUZEM ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS EM PEIXES-ZEBRA *(Danio rerio)*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração “Ciências da Saúde” (Linha de Pesquisa: Aspectos Imunopatológicos, Morfológicos, Celulares E Moleculares Das Doenças) da Universidade Federal do Triângulo Mineiro como requisito parcial para obtenção do título de mestre.

Uberaba, 20 de julho de 2026

Banca Examinadora:

Dr. Matheus Felipe Marcon – Orientador
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Dr. Julio Cesar de Souza Inácio Gonçalves
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Dr. Angelo Luis Stapassoli Piato
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Documento assinado eletronicamente por **MATHEUS FELIPE MARCON**, **Professor do Magistério Superior**, em 25/07/2026, às 10:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020 e no art. 34 da Portaria Reitoria/UFTM nº 215, de 16 de julho de 2024.

Documento assinado eletronicamente por **JULIO CESAR DE SOUZA INACIO GONCALVES**, **Professor do Magistério Superior**, em 28/07/2026, às 09:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de

novembro de 2020 e no art. 34 da Portaria Reitoria/UFTM nº 215, de 16 de julho de 2024.

Documento assinado eletronicamente por **Angelo Luis Stapassoli Piato**, **Usuário Externo**, em 29/07/2026, às 09:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020 e no art. 34 da Portaria Reitoria/UFTM nº 215, de 16 de julho de 2024.

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.uftm.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1822177** e o código CRC **346DDF94**.

Aos meus pais, pelo amor incondicional e pelos sacrifícios que fizeram para que eu chegasse até aqui. À minha avó, cuja força, sabedoria e carinho continuam presentes em minha vida e em minha memória. À minha tia, pelo carinho, incentivo e presença constante. E ao meu namorado, pelo amor, paciência e apoio incondicional em cada etapa desta jornada. A cada um de vocês, que sempre foram meu porto seguro nos momentos de alegria, incerteza e dificuldade, dedico esta conquista com todo meu amor e gratidão.

AGRADECIMENTOS

À minha avó, meu maior exemplo de força, dedicação e amor pelo conhecimento. Se hoje trilho o caminho da pesquisa e da vida acadêmica, devo isso, em grande parte, à inspiração que sempre encontrei em sua trajetória. Em uma época em que as mulheres enfrentavam barreiras ainda maiores para ocupar espaços na universidade, você desafiou expectativas, lutou pelos seus sonhos e se tornou uma excelente profissional e professora. Sua paixão pelo ensino e sua determinação continuam guiando meus passos. Espero honrar seu legado ao longo da minha trajetória acadêmica. Esta conquista também é sua.

Estendo meus agradecimentos à minha família, em especial aos meus pais, Deborah e Paulo, cujos esforços e sacrifícios para me proporcionar a melhor educação possível me trouxeram até aqui. Ao meu namorado, Guilherme, e à minha tia, Márcia, agradeço por estarem sempre ao meu lado, celebrando minhas conquistas. Aos demais familiares, sou imensamente grata pelo amor, apoio incondicional e incentivo de vocês, fundamentais em cada etapa desta caminhada.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Matheus Marcon, expresso minha sincera gratidão pelos ensinamentos, pela confiança e pela valiosa contribuição para a minha formação pessoal e científica. Graças à sua orientação e por acreditar no meu potencial, tive oportunidades e alcancei lugares que jamais imaginei serem possíveis.

Agradeço também ao grupo de pesquisa Neurofar, em especial às minhas companheiras de mestrado, Roberta e Lara Julia. A colaboração, a parceria e o apoio de vocês foram fundamentais para a realização deste trabalho. Sou muito grata por compartilhar essa trajetória ao lado de pessoas tão dedicadas. Ao Laboratório de Psicofarmacologia e Comportamento (LAPCOM) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), agradeço pela colaboração nas análises comportamentais realizadas com o *software ANY-maze*®, fundamentais para a realização deste trabalho.

Às professoras do laboratório, Profa. Karina Vicentini e Profa. Heloísa Vilela, agradeço pela disponibilidade, pelo incentivo constante e por toda a ajuda oferecida ao longo destes anos. À Thaís Farnesi, deixo um agradecimento especial pelos conselhos, almoços, risadas, ensinamentos e pela inspiração profissional. Tenho

muita sorte de fazer parte de um laboratório tão acolhedor e comprometido com a ciência.

Aos meus amigos de Ribeirão Preto pela paciência e por sempre estarem ao meu lado, mesmo de longe sempre se fazendo presente de alguma forma. Sou muito grata pela amizade e carinho de vocês, minha segunda família. Aos meus amigos de Uberaba, por estarem ao meu lado nas fases boas e ruins, vocês são meus maiores presentes que o retorno a Uberaba me deu.

Por fim, agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde pelo suporte e pela oportunidade de realizar minha formação em um programa de excelência. Em especial à secretária Tuânia, pela paciência, parceria e por todo o apoio. À Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), agradeço pelo financiamento deste projeto e pela concessão da bolsa de estudos, fundamentais para que eu pudesse me dedicar integralmente ao desenvolvimento desta pesquisa.

RESUMO

O aumento dos transtornos mentais configura um problema de saúde pública e tem impulsionado o uso de psicofármacos, elevando sua presença no ambiente aquático, principalmente, devido ao descarte inadequado e à remoção incompleta em estações de tratamento de água. Neste contexto, o peixe-zebra (*Danio rerio*) se destaca como um excelente bioindicador para avaliar os efeitos ambientais desses contaminantes na água. O objetivo deste estudo é avaliar os efeitos da exposição subaguda (7 dias) e prolongada (28 dias) a concentrações ambientalmente relevantes de diazepam, fluoxetina e haloperidol sobre o comportamento de peixes-zebra. Para isso, foram utilizados 280 peixes-zebra (*wild-type)* adultos, submetidos a protocolos independentes de exposição por imersão: subaguda (7 dias) e prolongada (28 dias) e distribuídos em 7 grupos de 20 animais: (1) controle; diazepam (2) 500 ng/L e (3) 5000 ng/L; fluoxetina (4) 500 ng/L e (5) 5000 ng/L; e haloperidol (6) 500 ng/L e (7) 5000 ng/L. Após a exposição, foram realizados os testes do tanque novo, claro/escuro e de preferência social para avaliação da atividade locomotora, comportamento semelhante à ansiedade e comportamento social. As análises comportamentais foram realizadas com os softwares ANY-maze® e BORIS® a análise estatística pelo teste de Kruskal-Wallis e ANOVA de uma via. A exposição subaguda à diazepam 500 ng/L e haloperidol 500 e 5000 ng/L aumentou a atividade locomotora, enquanto fluoxetina e haloperidol 5000 ng/L reduziram o comportamento semelhante à ansiedade no teste claro/escuro. A exposição prolongada ao haloperidol 500 ng/L reduziu o comportamento semelhante à ansiedade no teste do tanque novo e ao diazepam 500 ng/L e 5000 ng/L reduziu a locomoção e o comportamento social no teste de preferência social, respectivamente. Conclui-se que concentrações ambientalmente relevantes de diazepam, fluoxetina e haloperidol são capazes de alterar comportamentos inatos de peixes-zebra, especialmente após exposição prolongada, reforçando o potencial ecotoxicológico e a necessidade de estratégias mais eficazes para reduzir esses contaminantes do ambiente aquático.

Palavras-chave: Diazepam, fluoxetina, haloperidol, *zebrafish.*

ABSTRACT

The increasing prevalence of mental disorders has become a major public health concern, driving the widespread use of psychotropic drugs and, consequently, increasing their occurrence in aquatic environments. This contamination is primarily attributed to improper disposal practices and the incomplete removal of these compounds by wastewater treatment plants. In this context, the zebrafish (*Danio rerio*) has emerged as a valuable bioindicator for assessing the environmental impacts of pharmaceutical contaminants. This study aimed to evaluate the effects of subacute (7-day) and prolonged (28-day) exposure to environmentally relevant concentrations of diazepam, fluoxetine, and haloperidol on zebrafish behavior. A total of 280 adult wild-type zebrafish were used in two independent immersion exposure protocols (7 and 28 days) and randomly allocated into seven experimental groups (n = 20 per group): (1) control; diazepam at (2) 500 ng/L and (3) 5000 ng/L; fluoxetine at (4) 500 ng/L and (5) 5000 ng/L; and haloperidol at (6) 500 ng/L and (7) 5000 ng/L. Following exposure, fish were subjected to the Novel Tank Test, Light/Dark Test, and Social Preference Test to assess locomotor activity, anxiety-like behavior, and social behavior, respectively. Behavioral analyses were performed using the ANY-maze® and BORIS® software, and statistical analyses were conducted using the Kruskal-Wallis test and one-way ANOVA. Subacute exposure to diazepam (500 ng/L) and haloperidol (500 and 5000 ng/L) increased locomotor activity, whereas fluoxetine and haloperidol (5000 ng/L) reduced anxiety-like behavior in the Light/Dark Test. Prolonged exposure to haloperidol (500 ng/L) decreased anxiety-like behavior in the Novel Tank Test, while diazepam at 500 ng/L and 5000 ng/L reduced locomotor activity and social behavior, respectively in the Social Preference Test. These findings demonstrate that environmentally relevant concentrations of diazepam, fluoxetine, and haloperidol are capable of altering innate behavioral responses in zebrafish, particularly following prolonged exposure, highlighting their ecotoxicological potential and emphasizing the need for more effective strategies to reduce the release of these contaminants into aquatic environments.

Keywords: Diazepam, fluoxetine, haloperidol, zebrafish.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Síntese dos resultados comportamentais 36

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Esquema representativo das condições de habituação e manutenção dos peixes-zebra (*Danio rerio*). 20

Figura 2. Estrutura em 2D dos fármacos diazepam, fluoxetina e haloperidol. 22

Figura 3. Grupos experimentais. 23

Figura 4. Representação esquemática do teste do tanque novo. 25

Figura 5. Representação esquemática do teste claro/escuro. 26

Figura 6. Representação esquemática do teste de preferência social. 27

Figura 7. Representação esquemática dos testes comportamentais realizados. 28

Figura 8. Efeitos da exposição subaguda a diazepam (DZP), fluoxetina (FLX) e haloperidol (HAL) no teste de tanque novo. 29

Figura 9. Efeitos da exposição subaguda a diazepam (DZP), fluoxetina (FLX) e haloperidol (HAL) no teste claro/escuro. 30

Figura 10. Efeitos da exposição subaguda a diazepam (DZP), fluoxetina (FLX) e haloperidol (HAL) no teste de preferência social. 31

Figura 11. Efeitos da exposição prolongada a diazepam (DZP), fluoxetina (FLX) e haloperidol (HAL) no teste de tanque novo. 32

Figura 12. Mapas de calor representativos dos efeitos da exposição prolongada a diazepam (DZP), fluoxetina (FLX) e haloperidol (HAL) no teste de tanque novo. 33

Figura 13. Efeitos da exposição prolongada a diazepam (DZP), fluoxetina (FLX) e haloperidol (HAL) no teste claro/escuro. 34

Figura 14. Efeitos da exposição prolongada a diazepam (DZP), fluoxetina (FLX) e haloperidol (HAL) no teste de preferência social. 35

Figura 15. Mapas de rastreio representativos dos efeitos da exposição prolongada a diazepam (DZP) teste de preferência social. 36

LISTA DE SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância.
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais.
cm	Centímetros.
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal.
COVID-19	*Coronavirus Disease 2019*.
CTL	Controle.
DZP	Diazepam.
FLX	Fluoxetina.
GABA	Ácido gama-aminobutírico.
h	Horas.
HAL	Haloperidol.
HC - UFTM	Hospital de Clínicas da UFTM.
ISRSs	Inibidores seletivos da recaptação de serotonina.
L	Litros.
max	Máxima.
MG	Minas Gerais.
min	Mínima ou minutos.
ml	Mililitros.
ng/L	Nanogramas por litro.
OSF	*Open Science Framework.*
q.s.p	Quantidade suficiente para
UFTM	Universidade Federal do Triângulo Mineiro.
ZebLab	Laboratório de Zebrafish.
ºC	Graus Celsius.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO..... 15
2 OBJETIVOS..... 18
2.1 Objetivo geral..... 18
2.2 Objetivos específicos..... 19
3 METODOLOGIA..... 19
3.1 Aspectos éticos..... 19
3.2 Habituação e manutenção..... 19
3.3 Psicofármacos..... 20
3.4 Cálculo amostral..... 22
3.5 Protocolos de exposição e grupos experimentais..... 22
3.6 Análise comportamental..... 23
3.6.1 Teste do tanque novo..... 24
3.6.2 Teste claro/escuro..... 25
3.6.3 Teste de preferência social..... 26
3.7 Análise estatística..... 27
3.8 Uso de inteligência artificial..... 28
4 RESULTADOS..... 28
4.1 Exposição subaguda..... 28
4.1.1 Teste do tanque novo..... 28
4.1.2 Teste claro/escuro..... 29
4.1.3 Teste de preferência social..... 30
4.2 Exposição prolongada..... 31
4.2.1 Teste do tanque novo..... 31
4.2.2 Teste claro/escuro..... 34
4.2.3 Teste de preferência social..... 34
5 DISCUSSÃO..... 37
5.1 Exposição subaguda..... 38
5.2 Exposição prolongada..... 39
5.3 Principais achados nos diferentes tempos de exposição..... 41
5.4 Implicações ecotoxicológicas..... 42
5.5 Limitações e perspectivas..... 43
6 CONCLUSÃO..... 45
REFERÊNCIAS..... 46
Anexo I: Parecer técnico CEUA: Psicofármacos em concentrações ambientalmente relevantes induzem alterações comportamentais em peixes-zebra (*Danio rerio*)**..... 53**

1 INTRODUÇÃO

As condições psiquiátricas, como ansiedade, depressão e esquizofrenia, estão entre os transtornos mentais de maior prevalência da atualidade, representando um importante problema de saúde pública em escala mundial. Estima-se que, em 2019, mais de 1 bilhão de pessoas viviam com um transtorno mental, incluindo 14% dos adolescentes do mundo (National Institute of Mental Health, 2020). Além disso, a depressão e ansiedade aumentaram mais de 25% apenas no primeiro ano da pandemia, o que é preocupante, pois a depressão já é considerada a principal causa de incapacitação durante a vida (World Health Organization, 2022). Entre os fatores associados a esse crescimento destacam-se o estilo de vida moderno, a maior prevalência desses transtornos entre jovens, o uso excessivo de dispositivos eletrônicos e os impactos psicossociais decorrentes da pandemia (Huang *et al.*, 2025; Salari *et al.*, 2020; World Health Organization, 2022; Winkler *et al.*, 2020).

Como consequência desse aumento na incidência de transtornos mentais, houve um crescimento expressivo no consumo de psicofármacos, uma das principais formas de tratamento desse tipo de doença. Estima-se que, em 2030, os transtornos mentais ocupem o primeiro lugar entre as condições crônicas mais onerosas no mundo, com cerca de 6,5 trilhões de dólares (Insel *et al*., 2013; Brauer *et al.,* 2021). No entanto, o uso ampliado desses fármacos tem levado à sua introdução contínua no meio ambiente, caracterizando-os como contaminantes emergentes, definidos como substâncias potencialmente perigosas encontradas no meio ambiente, mas que ainda não são monitoradas ou regulamentadas de forma padrão (Argaluza *et al*., 2021; Puri, Gandhi e Kumar, 2023).

Inúmeros fatores têm contribuído para a inserção dessas substâncias no meio ambiente, como a excreção fisiológica, o descarte inadequado, o manejo inadequado dos resíduos durante a produção, e a ineficiência dos sistemas de tratamento de água (Argaluza *et al.*, 2021; Silva *et al.*, 2017; Kinrys *et al*., 2018). Considerando que grande parte dos fármacos apresenta atividade biológica mesmo em baixas concentrações, níveis detectados no meio ambiente podem ser suficientes para desencadear efeitos ecotoxicológicos em microrganismos, flora, fauna aquática e, potencialmente, na saúde humana, ainda que estejam abaixo dos

níveis associados à toxicidade letal (Hughes, Kay e Brown, 2013; Lindberg *et al.*, 2014; Sim *et al*., 2011).

A degradação de fármacos em ambientes aquáticos ocorre por processos bióticos e abióticos. Entre os principais mecanismos naturais de remoção em águas superficiais destacam-se a biodegradação microbiana, realizada por bactérias e fungos locais, e a fotólise, promovida pela incidência da radiação solar (Fernandes *et al*., 2021). No entanto, esses processos não são suficientes para degradar a quantidade de fármacos acumulada no meio aquático, pois muitas dessas substâncias são persistentes e resistentes à degradação e decomposição (Hama Aziz *et al.*, 2025).

Entre os psicofármacos frequentemente detectados no ambiente destacam-se o diazepam, um ansiolítico da classe dos benzodiazepínicos, amplamente utilizado no tratamento de transtornos de ansiedade, e age por meio da potencialização do efeito do neurotransmissor GABA, apresentando alta capacidade de inibição do sistema nervoso central. A fluoxetina, um antidepressivo, da classe dos inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRSs), utilizada como primeira escolha no tratamento da depressão, e atua aumentando a disponibilidade de serotonina na fenda sináptica, por meio do bloqueio de transportadores pré-sinápticos de serotonina. E o haloperidol, um antipsicótico típico muito utilizado no tratamento da esquizofrenia que age como antagonista do receptor D_2 de dopamina, atuando na via dopaminérgica, responsável pelas emoções, pelo aprendizado e pelo humor (Ritter *et al*., 2025).

No Brasil, a contaminação ambiental por fármacos é particularmente relevante, uma vez que estudos demonstram que as estações de tratamento de esgoto não removem completamente esses psicofármacos. Consequentemente, o diazepam foi detectado em 335 ng/L nas águas do Rio Guandu (RJ) e em até 645 ng/L em efluentes hospitalares (Formagini *et al*., 2025; de Almeida *et al*., 2013). A fluoxetina atingiu concentrações de até 1.342 ng/L nos rios urbanos de Curitiba (PR), além de 30,2 ng/g em sedimentos, e foi encontrada em até 60 ng/L na bacia do Rio Atibaia, em Campinas (SP) (Pivetta *et al.*, 2020; Gomes e Gomes, 2024). Já o haloperidol foi detectado entre 40 e 100 ng/L em águas superficiais do Rio Grande do Sul e entre 1.430 e 2.730 ng/L em efluentes hospitalares da mesma região (Reichert; Souza; Martins, 2019; Caldas *et al.*, 2016). Dessa maneira, a presença dessas substâncias em águas residuais junto à ineficiência do tratamento da água

favorece a exposição contínua da biota aquática a concentrações subagudas desses fármacos (Caldas *et al.*, 2016).

Esse cenário não se restringe ao território nacional, uma vez que diazepam e fluoxetina já foram encontrados até mesmo na água potável de diversos países, como Itália, Estados Unidos, China e Inglaterra (Benotti *et al.*, 2009; Kondor *et al.*, 2020; Peng, Gautam e Hall, 2019). Assim, a detecção de psicofármacos em ambientes aquáticos é preocupante, não apenas pelo seu acúmulo no ambiente, mas também pelo fato dessas substâncias atuarem em sistemas neuroendócrinos conservados evolutivamente, podendo afetar diversos animais aquáticos e até mesmo os seres humanos (Argaluza *et al*., 2021; Gunnarsson *et al.*, 2008).

No ambiente aquático, o risco ecotoxicológico dos psicofármacos é agravado pelos processos de biotransformação, que frequentemente geram metabólitos que retêm a atividade biológica do composto original. A fluoxetina, por exemplo, é convertida em metabólitos ativos (como a norfluoxetina) que apresentam forte tendência à bioacumulação e longa persistência nos organismos (Lajeunesse, Gagnon e Sauvé, 2008). Da mesma forma, a degradação do diazepam resulta na formação de derivados que continuam agindo ativamente sobre o sistema nervoso central, como o oxazepam (de Almeida *et al*., 2015). Dessa forma, a biota aquática permanece exposta não apenas às drogas precursoras, mas também a uma complexa mistura de metabólitos biologicamente ativos, tornando a avaliação da toxicidade crônica desses fármacos ainda mais relevante.

Dados da literatura mostram que a exposição ao diazepam e à fluoxetina, em diferentes concentrações, provocou redução da frequência cardíaca e do tamanho de larvas de peixe-zebra, bem como aumento da taxa de mortalidade (Kalichak *et al.,* 2016). Outras evidências demonstram que os antidepressivos podem alterar o comportamento reprodutivo de peixes da espécie *Perca fluviatilis* (Hedgespeth, Nilsson e Berglund, 2014), bem como o comportamento agressivo da truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) (Holmberg *et al*., 2011). Em relação aos antipsicóticos, foi descoberto que em baixas concentrações, podem afetar o comportamento social de diversos peixes, como a indução do comportamento de dominância e de agressividade de *Pimephales promelas* (Villeneuve *et al*., 2010; Brodin *et al.,* 2014; Escudero *et al*., 2021).

Nesse contexto, a presença crescente de psicofármacos em ambientes aquáticos tem despertado preocupação devido à capacidade dessas substâncias de

interferirem em sistemas neuroendócrinos conservados evolutivamente, podendo provocar importantes alterações fisiológicas, comportamentais e reprodutivas em organismos não alvo. Apesar do avanço das pesquisas envolvendo contaminantes emergentes, ainda existem lacunas importantes acerca dos efeitos neurocomportamentais e neurofisiológicos decorrentes da exposição prolongada a psicofármacos, especialmente envolvendo diferentes classes farmacológicas.

Diante desse cenário, torna-se fundamental investigar os efeitos desses contaminantes emergentes nos organismos vivos. O peixe-zebra (*Danio rerio*) destaca-se como modelo experimental relevante por diversas vantagens. Possui grande sensibilidade a contaminantes ambientais, atuando como um ótimo bioindicador, sendo amplamente utilizado em estudos ecotoxicológicos. Além disso, possui alta similaridade genética com humanos (cerca de 70%) e apresenta sistemas de neurotransmissores bem conservados evolutivamente (Howe *et al*., 2013), incluindo as vias GABAérgicas, dopaminérgicas e serotonérgicas, o que o torna um modelo relevante para estudos em neuropsicofarmacologia e comportamento (Kalueff, Stewart e Gerlai, 2013; Chia *et al.*, 2022). Adicionalmente, apresenta repertório comportamental complexo, permitindo a avaliação de parâmetros relacionados à ansiedade, exploração, sociabilidade, aprendizagem e memória por meio de testes comportamentais bem estabelecidos.

Muitos estudos trazem dados sobre exposições agudas e subagudas a psicofármacos, mas são poucos os que avaliam efeitos da exposição prolongada e crônica, o que é essencial para representar a realidade da poluição por psicofármacos no meio ambiente. Por isso, a realização desse estudo busca contribuir para a compreensão dos riscos ecotoxicológicos associados à contaminação ambiental por diazepam, fluoxetina e haloperidol, fornecendo informações relevantes para futuras estratégias de monitoramento ambiental, descarte adequado de medicamentos e desenvolvimento de métodos mais eficazes para remoção desses contaminantes emergentes da água.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito dos psicofármacos amplamente utilizados para o tratamento da ansiedade (diazepam), depressão (fluoxetina) e esquizofrenia (haloperidol) em concentrações ambientalmente relevantes sobre parâmetros comportamentais em peixes-zebra (*Danio rerio*).

2.2 Objetivos específicos

Avaliar os efeitos da exposição de 7 dias (subaguda) e 28 dias (prolongada) a diazepam, fluoxetina e haloperidol, em concentrações encontradas em corpos d'água em peixes-zebra, sobre:

A) Comportamento locomotor;
B) Comportamento semelhante à ansiedade;
C) Comportamento social;

3 METODOLOGIA

3.1 Aspectos éticos

Esse estudo foi aprovado em 13/08/2025 pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (CEUA - UFTM), sob o protocolo nº 23085.003474/2025-82 (Anexo A), em conformidade com a Lei nº 11.794/2008, Decreto nº 6.899/2009 e diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Além disso, o presente estudo também foi registrado na plataforma *Open Science Framework* (OSF).

3.2 Habituação e manutenção

Foram adquiridos 280 peixes-zebra (*wild type*) adultos, provenientes do estabelecimento comercial Alfa Peixes (CNPJ 32.310.903/0001-65), localizado em Uberaba (MG). Os animais foram mantidos conforme as recomendações do CONCEA (Brasil, 2023), alojados em aquários de vidro com capacidade de 20 litros de água (40 cm de comprimento x 25 cm de altura x 20 cm de profundidade) (Figura 1), contendo volume útil de 15 L de água não clorada, com sistema fechado de

recirculação e filtragem mecânica, respeitando uma densidade de 3 animais por litro. Os testes de amônia e pH foram realizados rotineiramente e a água dos aquários moradia foi trocada uma vez por semana. Seguindo as diretrizes do CONCEA, o fotoperíodo utilizado foi de 14h claro/10h escuro, temperatura de 27ºC ±1, pH 7 e alimentação duas vezes ao dia com ração seca da marca Poytara®. O período de habituação foi de 15 a 21 dias após a chegada ao Laboratório de Zebrafish (ZebLab - UFTM).

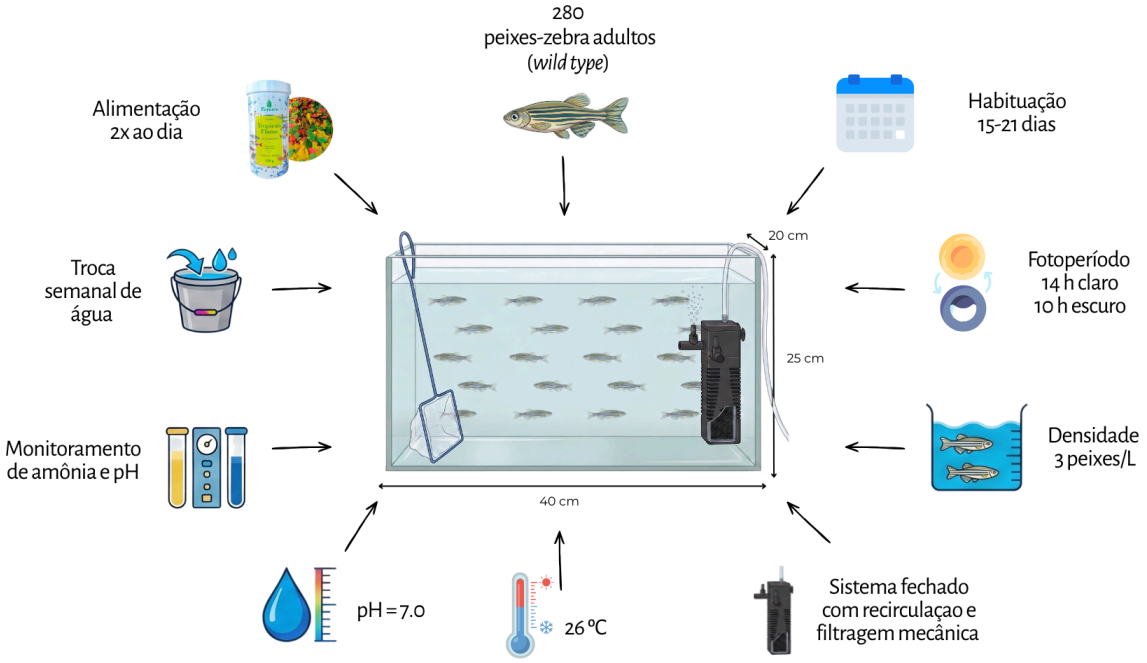


Figura 1. Esquema representativo das condições de habituação e manutenção dos peixes-zebra (*Danio rerio*). Período de habituação, alimentação, frequência de trocas de água, monitoramento da qualidade da água, temperatura, pH, fotoperíodo, densidade de estocagem e sistema de recirculação utilizados neste estudo. Fonte: Elaboração própria, 2026.

3.3 Psicofármacos

Os psicofármacos utilizados neste estudo foram diazepam, fluoxetina e haloperidol (Figura 2). O diazepam (5 mg/mL; Santisa Laboratório Farmacêutico, Bauru, SP, Brasil) e o haloperidol (5 mg/mL; União Química, São Paulo, SP, Brasil) foram obtidos na forma de soluções injetáveis (ampolas) na farmácia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (HC-UFTM), mediante autorização prévia. A fluoxetina foi adquirida comercialmente como solução oral de cloridrato de fluoxetina (20 mg/mL; Medley, Campinas, SP, Brasil). As concentrações

testadas de cada psicofármaco testadas nesse estudo foram determinadas com base na análise de evidências das concentrações ambientais descritas na literatura (Lan et al., 2019; Khan et al., 2021; Gomes e Gomes, 2024; Salgado et al., 2011; Reichert; Souza; Martins, 2019; Caldas *et al*., 2016). Os testes foram realizados em aquários de 15 L, adotando-se as concentrações de 500 ng/L e 5000 ng/L.

Devido às baixas concentrações empregadas, o volume a ser extraído das embalagens originais necessário para obtenção das concentrações experimentais seria muito baixo, comprometendo a precisão da pipetagem. Dessa forma, foram preparadas soluções-mãe de 0,075 mg/mL e 0,0075 mg/mL de diazepam, fluoxetina e haloperidol em balões volumétricos de 50 mL, utilizando água declorada contendo tiossulfato de sódio. Para a fluoxetina, as soluções-mãe foram preparadas a partir da pipetagem de 187,5 µL e 18,75 µL da formulação comercial de 20 mg/mL para o balão volumétrico preenchido com *q.s.p*. 50 mL de água declorada. Para o diazepam e o haloperidol, foram pipetados 750 µL e 75 µL da formulação original de 5 mg/mL para o balão volumétrico preenchido com *q.s.p*. 50 mL de água declorada. Em seguida, cada aquário de exposição foi preparado com 15 L de água declorada, então, por meio de pipetagem, 1 mL foi retirado do aquário e posteriormente adicionado 1 mL das respectivas soluções-mães, resultando nas concentrações finais de exposição de diazepam, fluoxetina e haloperidol de 5000 ng/L e 500 ng/L, respectivamente.

Para minimizar possíveis vieses experimentais, o preparo e a administração das soluções foram realizados por três pesquisadores distintos. Um pesquisador foi responsável pelo preparo das soluções-mãe dos psicofármacos, um segundo pesquisador realizou a codificação das soluções, e um terceiro, sem conhecimento da identidade dos tratamentos, realizou a pipetagem das soluções codificadas nos aquários experimentais. Os códigos dos tratamentos foram mantidos até a conclusão das exposições e das análises comportamentais, garantindo que essas etapas fossem conduzidas de forma cega.

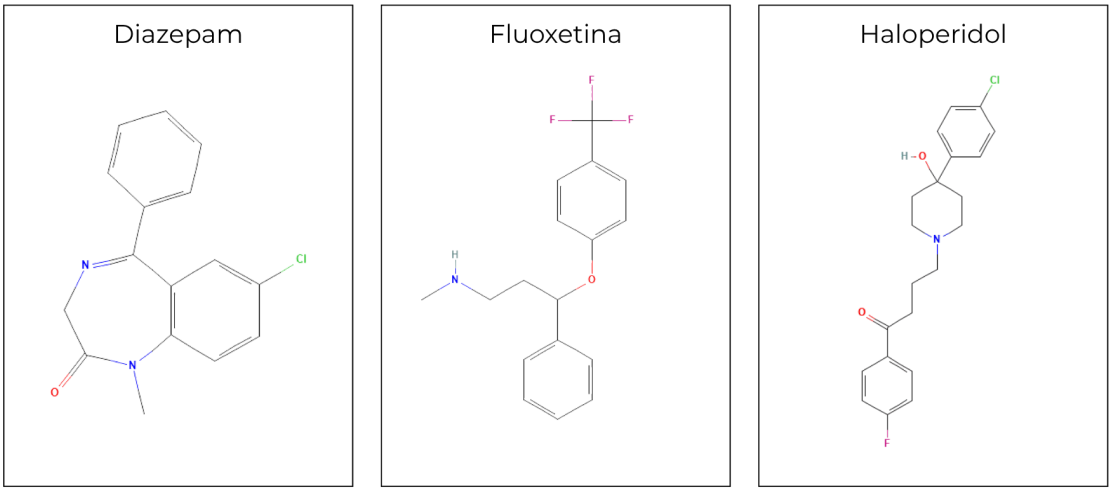


Figura 2. Estrutura em 2D dos fármacos diazepam, fluoxetina e haloperidol. Fonte: National Center for Biotechnology (2026).

3.4 Cálculo amostral

O delineamento experimental e o cálculo do tamanho amostral foram planejados para garantir poder estatístico adequado e, simultaneamente, reduzir o número de animais utilizados, em conformidade com os princípios dos 3Rs (Redução, Refinamento e Substituição) (CONCEA, 2016). O tamanho amostral foi estimado com base em estudos prévios com exposição de peixes-zebra a psicofármacos e avaliação comportamental/molecular (Valadas *et al.*, 2019; Valadas *et al.*, 2021) e confirmados utilizando o software *G*Power*. Foram adotados níveis de significância de 5% (α = 0,05), poder estatístico (1−β) = 0,95 e tamanho de efeito de grande (f = 0,4).

3.5 Protocolos de exposição e grupos experimentais

Para a avaliação dos efeitos de diazepam (DZP), fluoxetina (FLX) e haloperidol (HAL) em concentrações ambientalmente relevantes, foram realizados dois protocolos de exposição ao longo do estudo: subagudo (7 dias) e prolongado (28 dias). Os psicofármacos foram administrados por imersão em aquários de sistema fechado com aeração, sem filtros, para evitar a remoção dos compostos. Na exposição subaguda, utilizou-se um sistema estático, sem renovação da água, a fim de minimizar o estresse de manejo, uma vez que a manipulação física pode alterar as respostas de estresse e interferir nos resultados comportamentais (Abreu *et al.*, 2014). Além disso, esse período foi considerado seguro para manutenção da

qualidade da água de acordo com observações anteriores realizadas no laboratório. Já na exposição prolongada, a água e os psicofármacos foram renovados semanalmente para garantir o bem-estar dos animais, evitando o acúmulo de compostos nitrogenados, e manter concentrações constantes dos fármacos, que diminuem ao longo do tempo devido à bioconcentração e depuração pelos organismos (Ivankovic *et al.*, 2024). 140 animais foram utilizados em cada protocolo de exposição (subaguda e prolongada), divididos em 7 grupos experimentais com n = 20 (Figura 3). A distribuição dos animais foi realizada de forma cega e randomizada, e a geração de números verdadeiramente aleatórios foi realizada com o auxílio do *Random.org.*

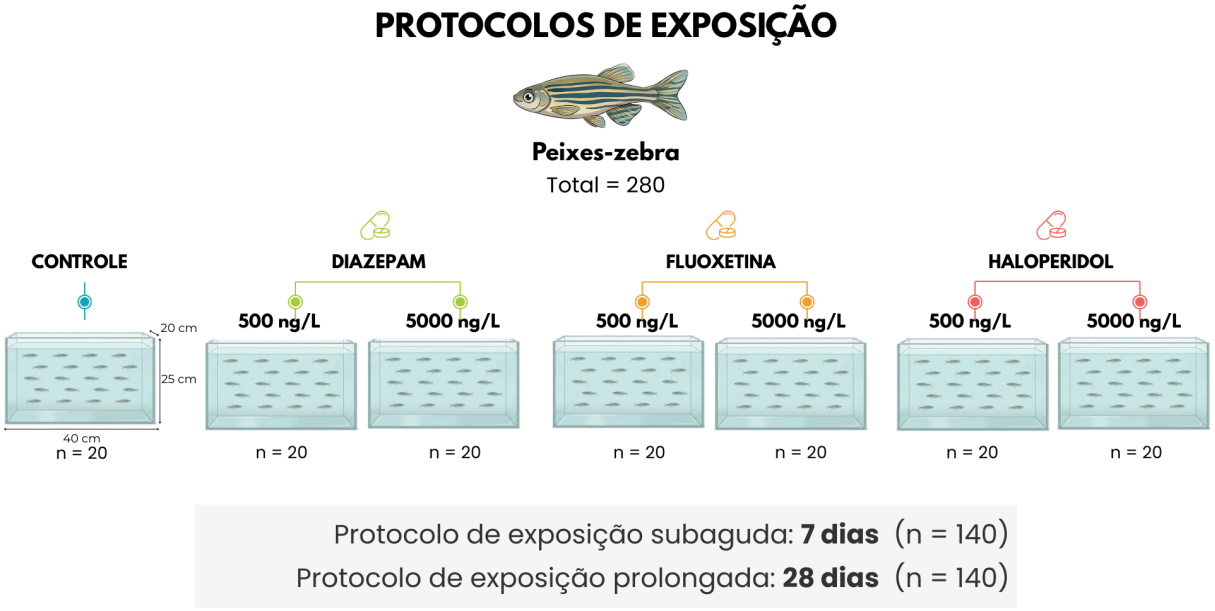


Figura 3. Grupos experimentais. 7 grupos com 20 animais em cada: controle (**1**); diazepam 500 ng/L (**2**) e 5000 ng/L (**3**); fluoxetina 500 ng/L (**4**) e 5000 ng/L **(5);** haloperidol 500 ng/L **(6)** e 5000 ng/L **(7)**. Foram realizados 2 protocolos de exposição, sendo 1 protocolo de exposição de 7 dias (subagudo) e outro de 28 dias (prolongado) utilizando 140 animais. **Fonte:** Elaboração própria, 2026.

3.6 Análise comportamental

Ao final do período de exposição, os animais foram submetidos a três testes comportamentais: (1) teste do tanque novo (Levin, Bencan e Cerutti, 2007); (2) teste claro/escuro (Maximino *et al.,* 2010); e (3) teste de preferência social (Engeszer, Ryan e Parichy, 2004), respectivamente, em três dias consecutivos. No entanto, os animais permaneceram no aquário de exposição até o último ensaio comportamental, dessa forma, ao fim das análises comportamentais, os peixes

voltavam para o aquário de exposição. Ademais, durante os testes a água dos aquários foi renovada a cada filmagem para todos os animais. Os comportamentos foram registrados individualmente por uma câmera (*WebCam Logitech C930e*). As análises de comportamento foram realizadas de forma cega, utilizando amostras codificadas para garantir a imparcialidade dos resultados, e a decodificação foi realizada apenas após o processamento completo dos dados nos *softwares* ANY-maze® (Stoelting Co., Wood Dale, IL, EUA) e Boris® (Figura 7).

3.6.1 Teste do tanque novo

O teste do tanque novo é muito utilizado para avaliar parâmetros de locomoção e comportamentos semelhantes à ansiedade, baseados no comportamento inato do zebrafish de permanecer inicialmente nas regiões inferiores do ambiente desconhecido (tanque novo), explorando gradualmente as regiões superiores, o que é denominado como geotaxia. Dessa maneira, o aumento do tempo na zona superior normalmente é interpretado como redução do comportamento do tipo ansioso, ao passo que a presença prolongada na zona inferior indica maior aversão ao ambiente novo (Levin, Bencan e Cerutti, 2007).

O teste foi realizado no primeiro dia de testes comportamentais e cada peixe foi filmado individualmente por 6 minutos, com 1 minuto de aclimatação ao aparato de teste (Figura 4A). O aquário é de vidro e retangular (24 cm de comprimento x 20 cm de altura x 8 cm de profundidade), com fundo revestido por um adesivo branco. Entre cada aquário teste havia uma barreira física de papel branco para impedir a visão entre os animais testados. Durante as análises no software ANY-maze®, o aquário foi virtualmente dividido em três zonas: inferior, intermediária e superior (Figura 4B). Os principais parâmetros avaliados neste teste foram: (1) tempo na zona superior (desfecho principal), (2) tempo na zona inferior, (3) distância total percorrida e (4) cruzamentos.

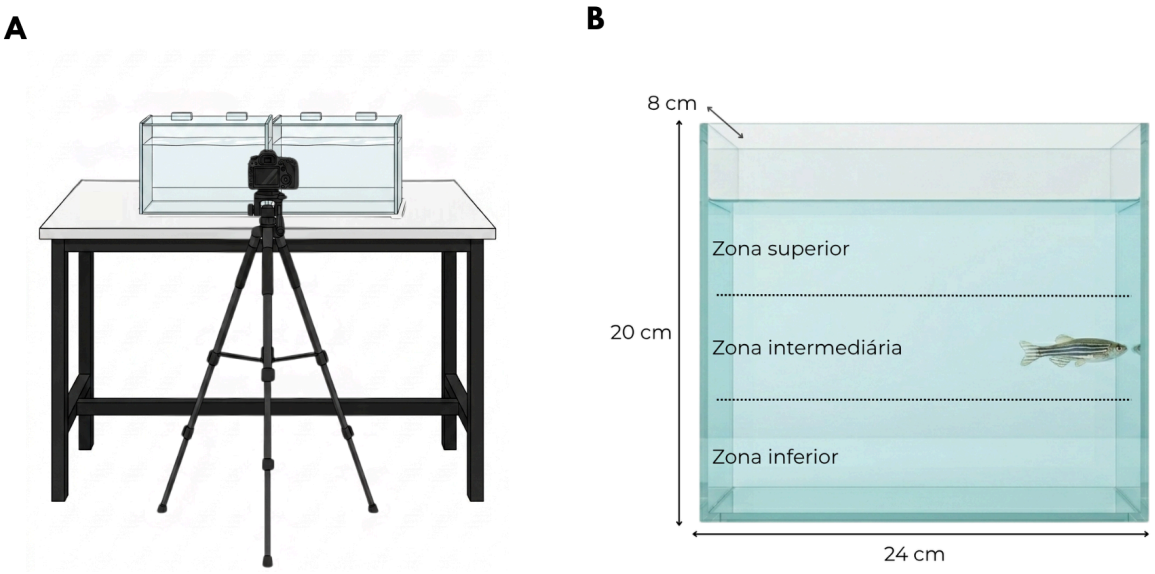


Figura 4. Representação esquemática do teste do tanque novo e especificações do tanque de teste. **(A)** Esquema de filmagem; **(B)** dimensões e divisões virtuais do aquário utilizado. **Fonte:** Elaboração própria, 2026.

3.6.2 Teste claro/escuro

O teste claro/escuro é um ensaio comportamental amplamente consolidado para avaliar o comportamento semelhante à ansiedade em peixe-zebra e atividade locomotora (Maximino *et al.,* 2010), já que esses animais apresentam um comportamento inato de preferência por ambientes escuros (escototaxia), devido a sua origem em regiões de lagos turvos e à estratégia de evitação de predadores.

Este teste foi realizado no segundo dia de testes comportamentais conforme protocolo descrito por Maximino *et al.* (2010), com adaptações. Os animais foram colocados inicialmente no lado escuro e filmados individualmente por 5 minutos, com 1 minuto de aclimatação (Figura 5A). O aparato de teste consistiu em um aquário retangular de vidro (20 cm de comprimento x 10 cm de altura x 8 cm de profundidade) e foi preenchido com volume de água de 600 ml (Figura 5B). Metade do aparato foi revestida por um adesivo preto (área escura) e a outra metade com um adesivo branco (zona clara). Os parâmetros avaliados neste teste foram: (1) tempo na zona clara (desfecho principal) e (2) cruzamentos entre as zonas.

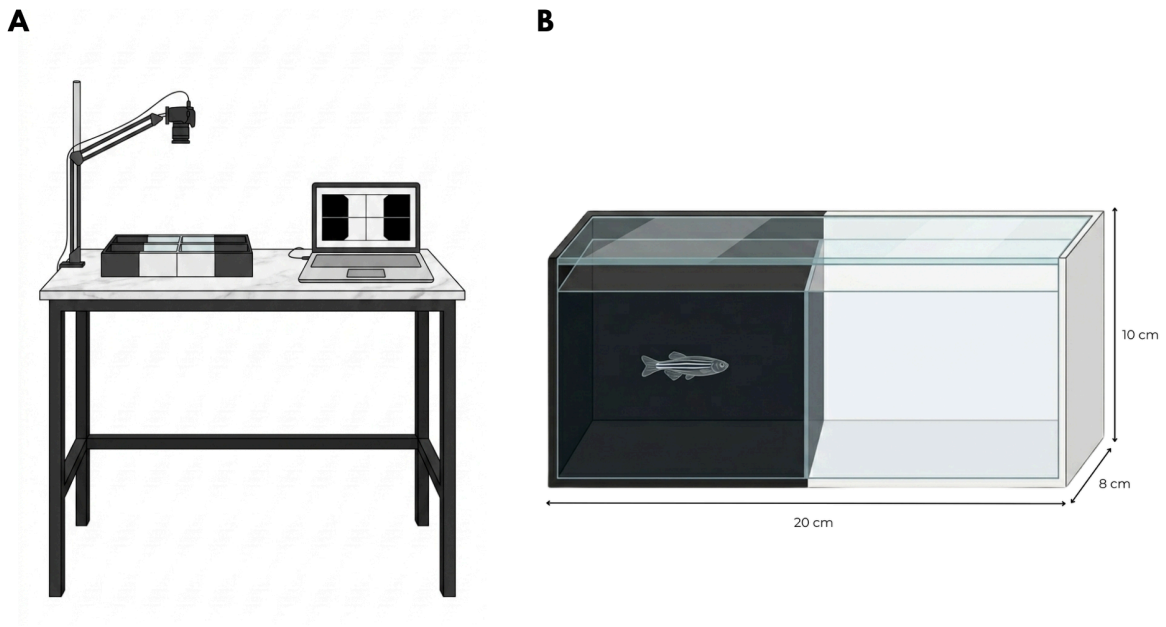


Figura 5. Representação esquemática do teste claro/escuro. **(A)** Esquema de filmagem; **(B)** dimensões do aquário utilizado. **Fonte:** Elaboração própria, 2026.

3.6.3 Teste de preferência social

O teste de preferência social consiste em colocar o animal teste no aquário intermediário, onde de um lado fica um aquário vazio e do outro fica o aquário estímulo com peixes-zebra, a fim de avaliar o tempo de permanência do animal na zona de interação (próxima ao aquário estímulo) (Benvenutti *et al.*, 2021). Sabe-se que o peixe-zebra é uma espécie gregária, com comportamento natural de cardume (*shoaling*), o que representa uma importante estratégia de defesa contra predadores e favorece o sucesso reprodutivo (Engeszer, Ryan e Parichy, 2004; Giacomini *et al.*, 2016; Chen *et al*., 2021).

O teste foi realizado no terceiro dia de testes comportamentais, no qual o comportamento foi gravado individualmente durante 7 minutos, com 2 minutos de aclimatação (Figura 6A). O aparato de teste consistiu de um aquário teste central (24 cm de comprimento x 20 cm de altura x 8 cm de profundidade) com fundo revestido por um adesivo branco e dois aquários menores na extremidade (8 cm de comprimento x 20 cm de altura x 8 cm de profundidade), sendo que em um deles continha 5 coespecíficos e foi considerado o aquário estímulo, enquanto o aquário do outro lado foi completado com água no mesmo nível do aquário teste central sem

coespecíficos (Figura 6B). Entre cada aquário teste havia uma barreira física de papel branco para impedir a visão entre os animais testados. Durante a análise dos vídeos no *software* ANY-maze®, o aquário teste central foi dividido virtualmente em 3 zonas (zona neutra, intermediária e de interação) e os seguintes parâmetros foram avaliados: (1) tempo na zona de interação (desfecho principal) e (2) tempo na zona neutra, (3) distância total e (4) número de cruzamentos.

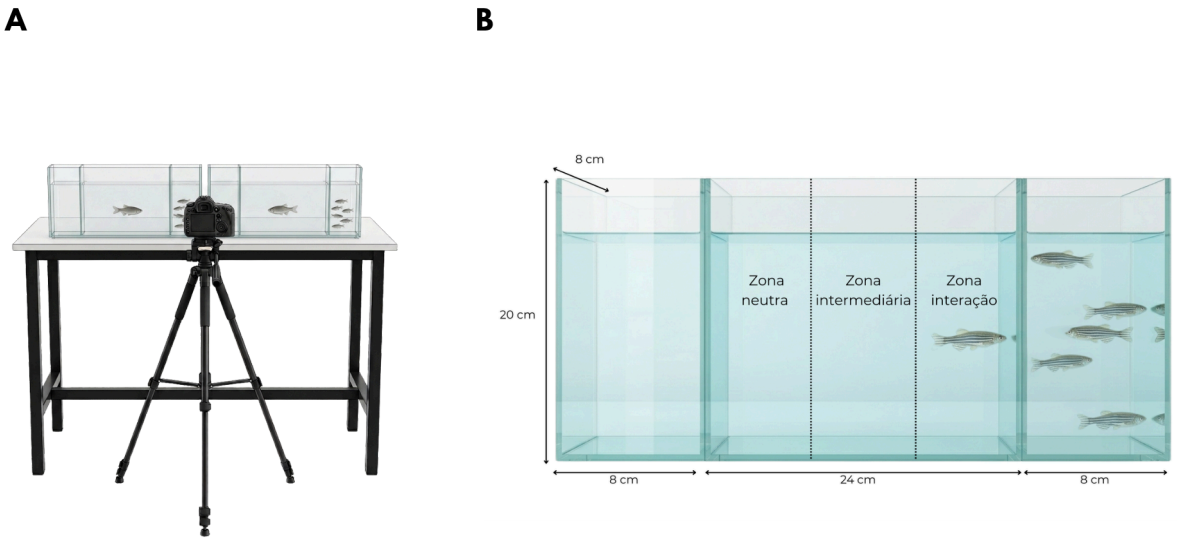


Figura 6. Representação esquemática do teste de preferência social. **(A)** Esquema de filmagem; **(B)** dimensões e divisões virtuais dos aquários utilizados. Fonte: Elaboração própria, 2026.

3.7 Análise estatística

Todas as análises estatísticas foram conduzidas no software *GraphPad Prism* versão 8.1.0 para Windows e os experimentadores estavam cegos para os grupos experimentais. A análise estatística dos dados foi iniciada pela verificação da normalidade, por meio dos testes Anderson-Darling e D'Agostino & Pearson. Para dados não paramétricos, foram utilizados os testes de Kruskal-Wallis seguidos do teste *post hoc* de Dunn, com valores expressos em mediana ± intervalo interquartil. Para os dados paramétricos a análises estatísticas foram realizadas utilizando ANOVA de uma via, seguida do teste *post hoc* de Tukey, com dados expressos como média ± desvio padrão. Diferenças estatísticas foram consideradas para $p<0,05$. Houve exclusão dos animais apenas para morte ou para congelamento (*freezing*) > 50% do tempo total do teste para o teste claro/escuro.

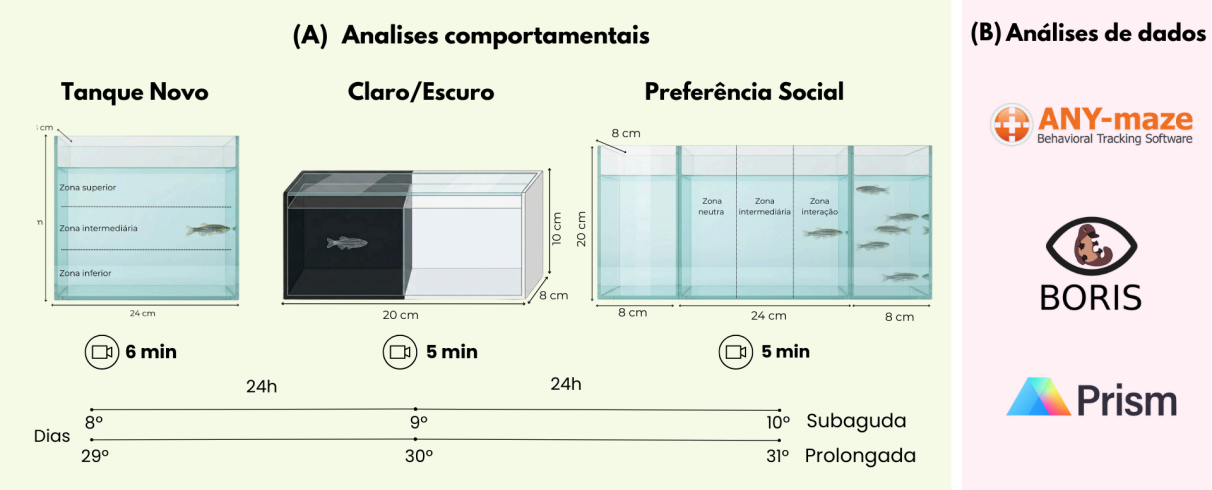


Figura 7. Representação esquemática dos testes comportamentais realizados. **(A)** Testes comportamentais realizados e tempos de exposição analisados. **(B)** Softwares utilizados para as análises dos parâmetros comportamentais dos vídeos registrados e para realizar as análises estatísticas dos dados obtidos.

3.8 Uso de inteligência artificial

Durante a elaboração desta dissertação, tecnologias de Inteligência Artificial generativa, especificamente o modelo Gemini, foram utilizadas estritamente como ferramentas de revisão gramatical e na confecção de alguns elementos visuais presentes nas figuras. A pesquisa teórica, a redação integral de todo o manuscrito, o delineamento experimental, a coleta de dados, as análises estatísticas e a interpretação dos resultados foram conduzidas exclusivamente pela autora, que assume total responsabilidade pelo conteúdo intelectual e final apresentado neste documento.

4 RESULTADOS

4.1 Exposição subaguda

4.1.1 Teste do tanque novo

A Figura 8 mostra os resultados do teste comportamental do tanque novo após o protocolo de exposição subaguda aos psicofármacos diazepam (DZP), fluoxetina (FLX) e haloperidol (HAL). Os resultados do teste de Kruskal-Wallis indicaram um efeito significativo para tempo na zona superior ($H = 22,64$, $p = 0,0009$), tempo na zona inferior ($H = 20,36$, $p < 0,01$), distância ($H = 12,79$, $p =$

0,0465) e cruzamentos (H = 15,03, *p* = 0,0200). No entanto, as análises *post hoc* não revelaram efeito significativo em comparação ao grupo controle.

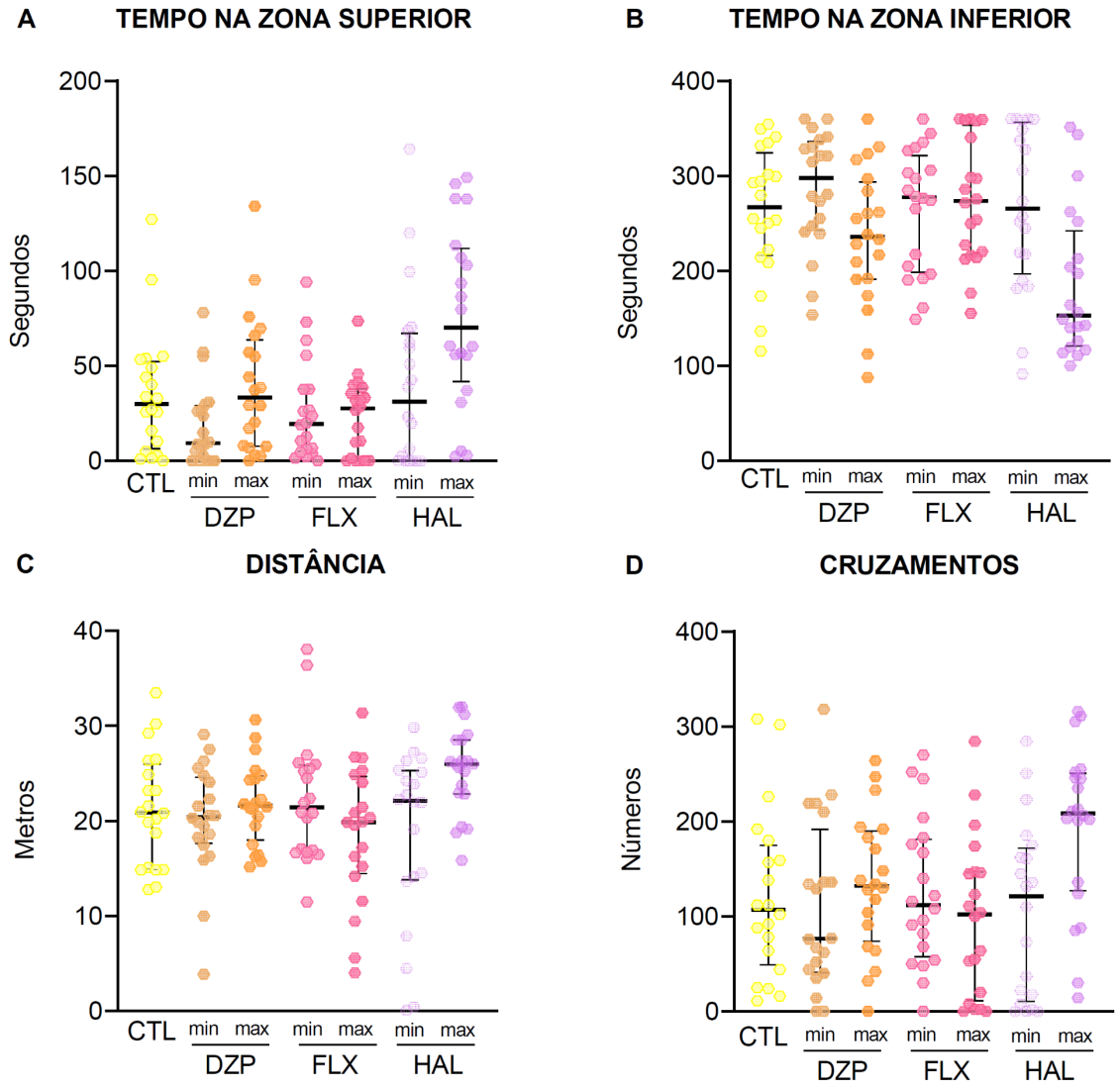


Figura 8. Efeitos da exposição subaguda a diazepam (DZP), fluoxetina (FLX) e haloperidol (HAL) no teste de tanque novo. min: 500 ng/L; max: 5000 ng/L. Os dados foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste *post hoc* de Dunn e apresentados como mediana ± intervalo interquartil. *n* = 20. **p*<0,05.

4.1.2 Teste claro/escuro

A Figura 9 mostra os resultados do teste claro/escuro após o protocolo de exposição subaguda a DZP, FLX e HAL. O teste de Kruskal-Wallis indicou efeito significativo para tempo de permanência na zona clara (Figura 9A, H = 18,90; *p* = 0,0043) e para o número de cruzamentos (Figura 9B, H = 25,30; *p* = 0,0003). As análises *post hoc* revelaram aumento significativo no tempo de permanência na

zona clara nos grupos FLX 5000 ng/L (p = 0,0019) e HAL 5000 ng/L (p = 0,0164) em comparação com o grupo controle (Figura 9A), bem como aumento no número de cruzamentos no grupo DZP 500 ng/L (p = 0,0262), HAL 500 (p = 0,0088) e 5000 ng/L (p < 0,0001) em comparação com o grupo controle (Figura 9B).

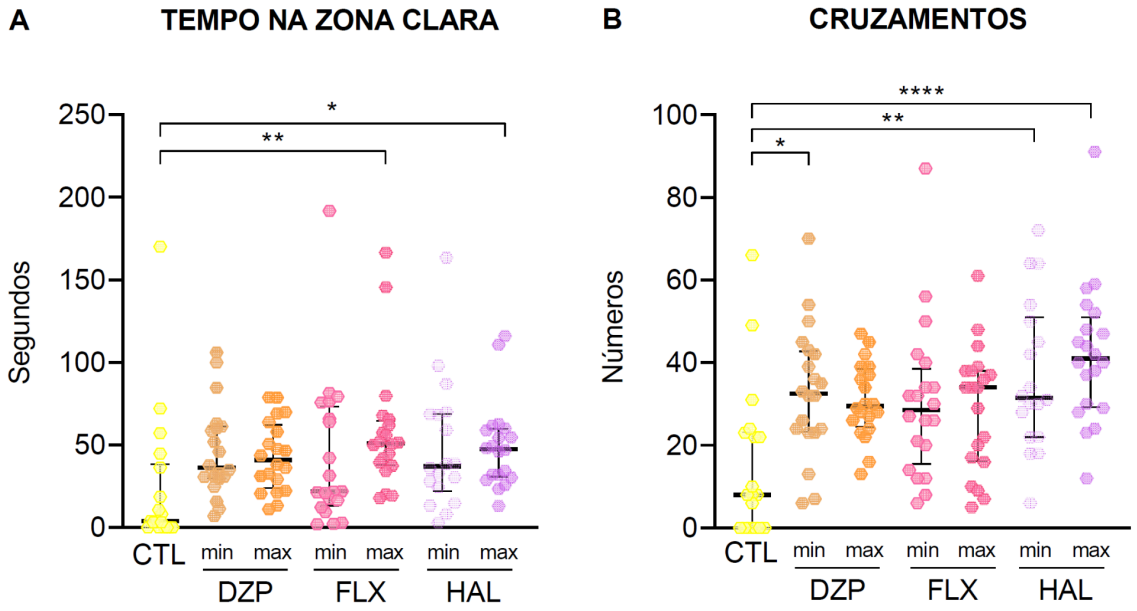


Figura 9. Efeitos da exposição subaguda a diazepam (DZP), fluoxetina (FLX) e haloperidol (HAL) no teste claro/escuro. min: 500 ng/L; max: 5000 ng/L. Os dados foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste *post hoc* de Dunn e são apresentados como mediana ± intervalo interquartil. n = 20, exceto CTL (n = 18) e HAL min (n = 18). *p<0,05, **p<0,01, ****p<0,0001 vs. grupo controle.

4.1.3 Teste de preferência social

A Figura 10 mostra os resultados do teste de preferência social após o protocolo de exposição subaguda aos psicofármacos DZP, FLX e HAL. O teste de Kruskal-Wallis revelou que houve efeito significativo apenas para o parâmetro de distância (H = 17,50; p = 0,0076), no entanto as análises *post hoc* não revelaram diferença em relação ao grupo controle.

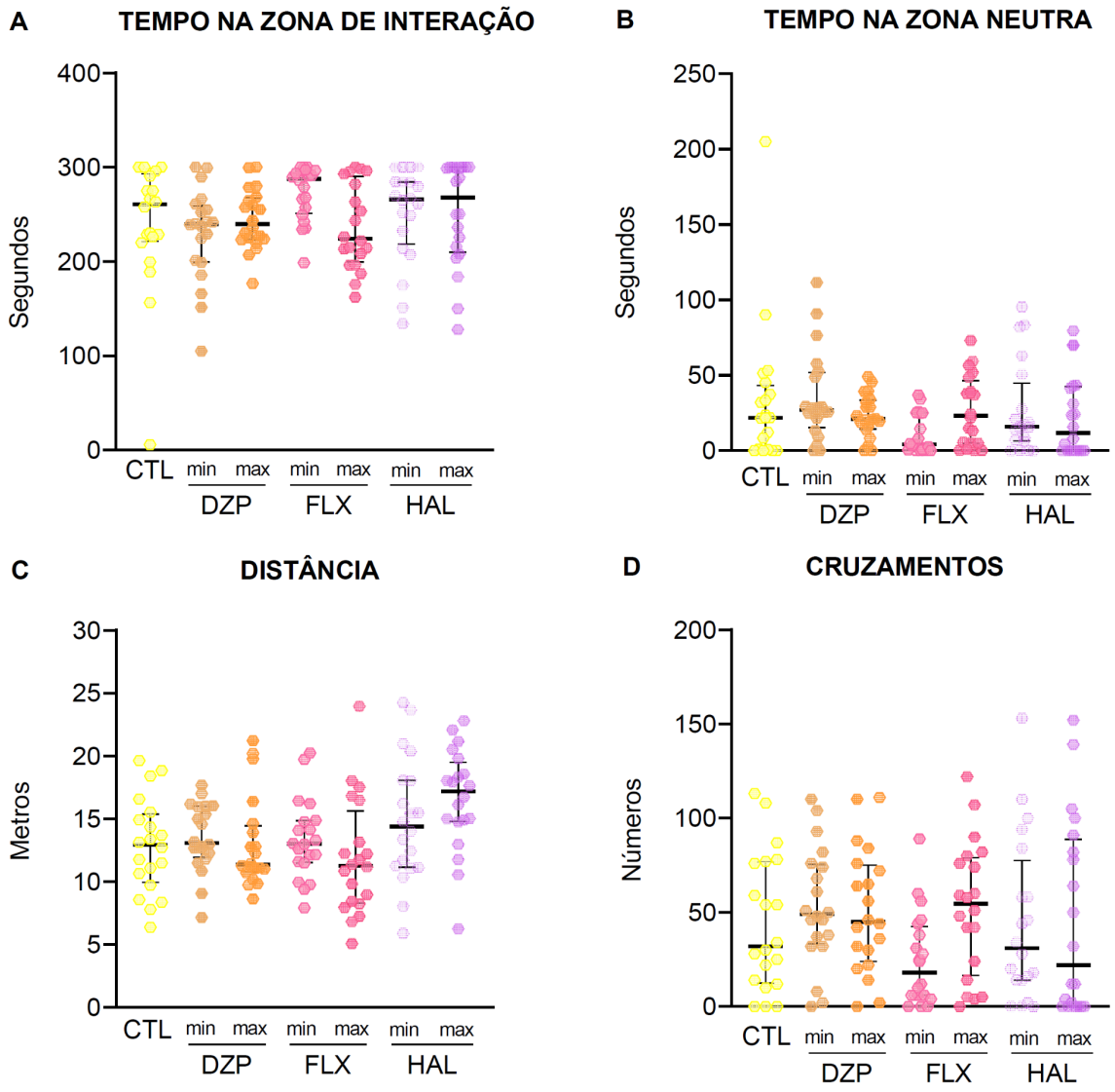


Figura 10. Efeitos da exposição subaguda a diazepam (DZP), fluoxetina (FLX) e haloperidol (HAL) no teste de preferência social. min: 500 ng/L; max: 5000 ng/L. Os dados foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis e são apresentados como mediana ± intervalo interquartil. *n* = 20

4.2 Exposição prolongada

4.2.1 Teste do tanque novo

A Figura 11 mostra os resultados do teste de tanque novo após o protocolo de exposição prolongada a DZP, FLX e HAL. O teste de Kruskal-Wallis revelou efeito significativo para os parâmetros de tempo gasto na zona superior (Figura 11A, H = 29,17, $p < 0,0001$), tempo gasto na zona inferior (Figura 11B, H = 49,22, $p < 0,0001$) e número de cruzamentos (Figura 11D, H = 13,70, $p = 0,0332$). O teste *post hoc*

revelou que o grupo HAL 500 ng/L apresentou um aumento do tempo de permanência na zona superior (Figura 11A, p = 0,0012) e diminuição do tempo de permanência na zona inferior (Figura 11B, p = 0,0002) quando comparado ao grupo controle.

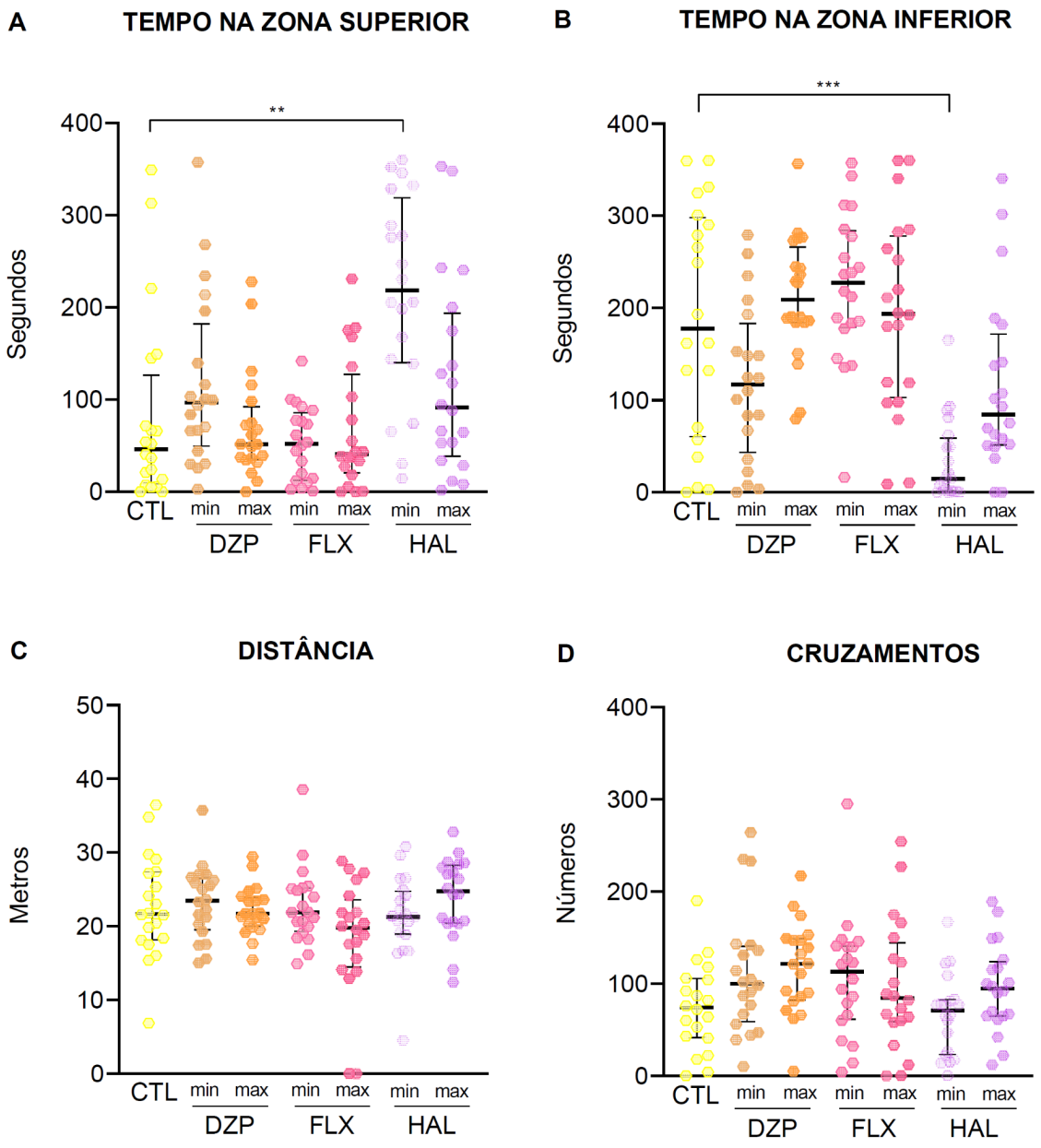


Figura 11. Efeitos da exposição prolongada a diazepam (DZP), fluoxetina (FLX) e haloperidol (HAL) no teste de tanque novo. min: 500 ng/L; max: 5000 ng/L. Os dados foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste *post hoc* de Dunn e são apresentados como mediana ± intervalo interquartil. n = 20. * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001 vs. grupo controle.

A Figura 12 mostra a distribuição espacial média dos animais de cada grupo experimental por meio de mapas de calor, nos quais a intensidade das cores representa o tempo médio de permanência em cada região do aquário.

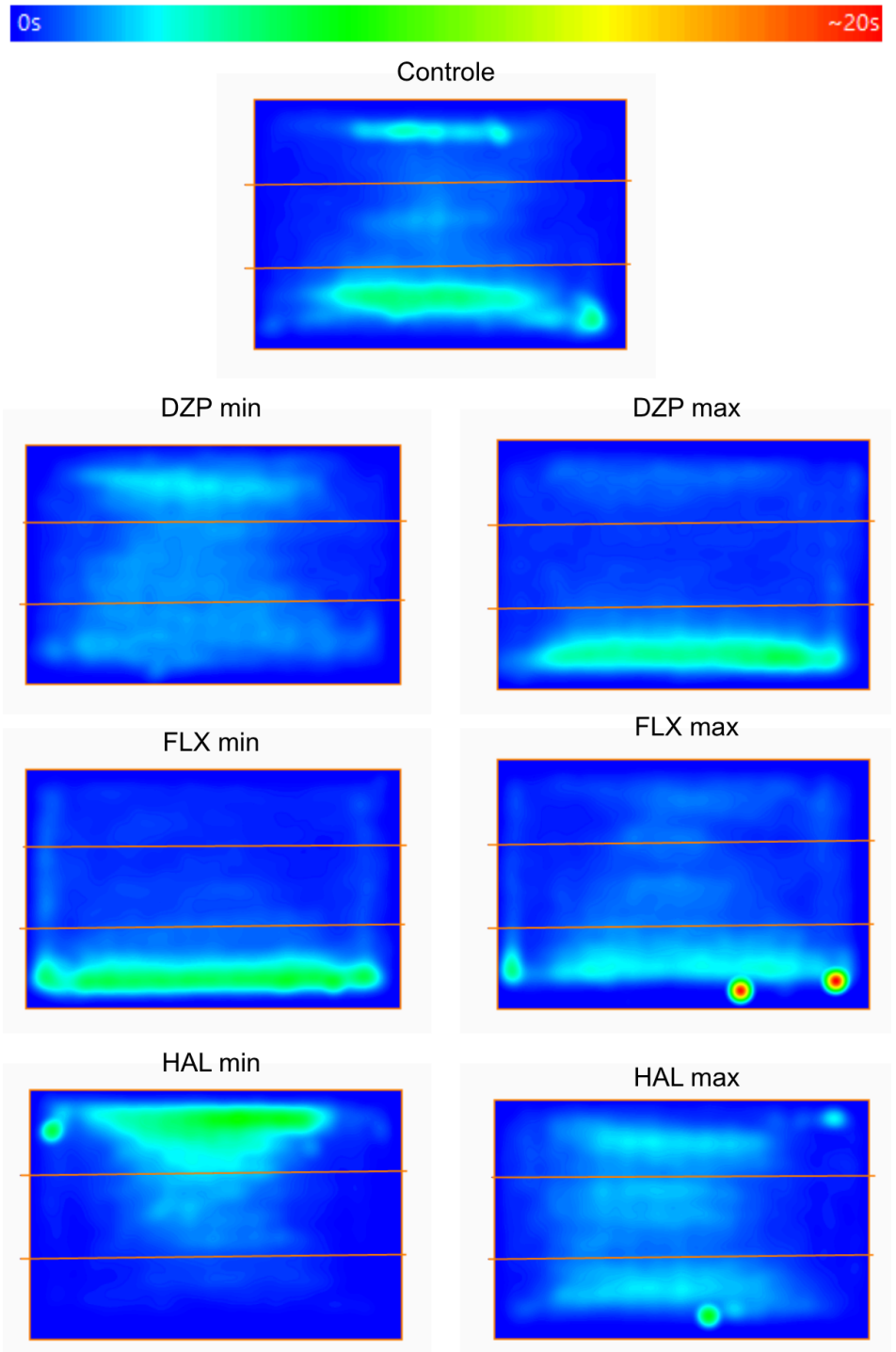


Figura 12. Mapas de calor representativos dos efeitos da exposição prolongada a diazepam (DZP), fluoxetina (FLX) e haloperidol (HAL) no teste de tanque novo. min: 500 ng/L; max: 5000 ng/L. Cada mapa representa a média da distribuição espacial dos animais do mesmo grupo experimental (n = 20). A escala de cores indica o tempo de permanência em cada região do aquário, variando de azul (menor tempo de permanência) a vermelho (maior tempo de permanência). As linhas horizontais delimitam as zonas virtuais superior, intermediária e inferior do tanque utilizadas para a análise comportamental.

4.2.2 Teste claro/escuro

A Figura 13 mostra os resultados comportamentais do teste claro/escuro após o protocolo de exposição prolongada a DZP, FLX e HAL. A ANOVA de uma via revelou efeito significativo apenas para o parâmetro cruzamentos (Figura 13B, $F_{6,128}$ = 5,079, p = 0,0001). O teste *post hoc* não revelou diferenças significativas em comparação com o grupo controle.

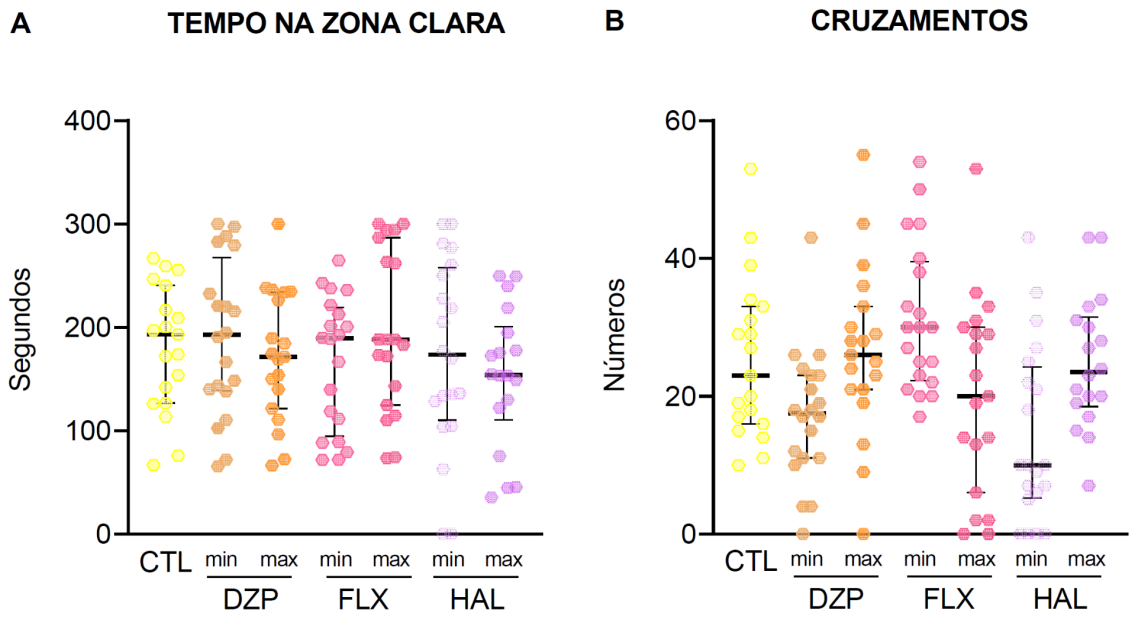


Figura 13. Efeitos da exposição prolongada a diazepam (DZP), fluoxetina (FLX) e haloperidol (HAL) no teste claro/escuro. min: 500 ng/L; max: 5000 ng/L. Os dados foram analisados pelo teste ANOVA de uma via seguido pelo teste *post hoc* de Tukey e são apresentados como média ± desvio padrão. n = 20, exceto CTL (n = 19), DZP max (n = 19), FLX max (n = 19) e HAL max (n = 18). *p<0,05.

4.2.3 Teste de preferência social

A Figura 14 mostra os resultados do teste de preferência social após a exposição prolongada a DZP, FLX e HAL. A ANOVA de uma via revelou efeito significativo para o tempo gasto na zona de interação (Figura 14A, $F_{6,132}$ = 13,33, p < 0,0001), tempo gasto na zona neutra (Figura 14B, $F_{6,132}$ = 22,54, p < 0,0001) e distância percorrida (Figura 14C, $F_{6,132}$ = 4,229, p = 0,0006). As análises *post hoc* revelaram que o grupo DZP 5000 ng/L permaneceu menos tempo na zona de interação (Figura 14A, p < 0,0001) e mais tempo na zona neutra (Figura 14B, p < 0,0001), enquanto DZP 500 ng/L diminuiu a distância percorrida (Figura 14C, p =0,0041) em comparação com o grupo controle.

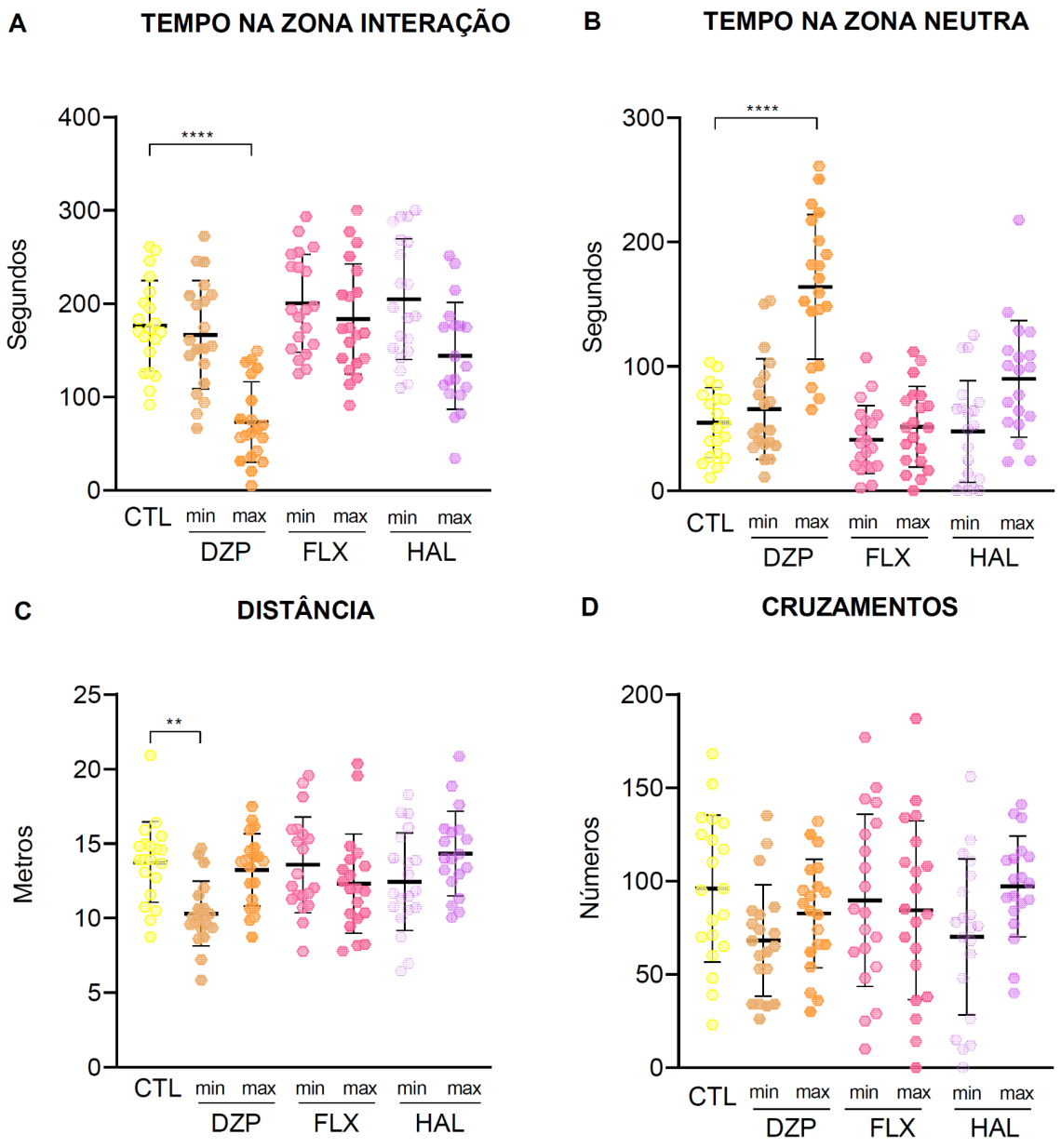


Figura 14. Efeitos da exposição prolongada a diazepam (DZP), fluoxetina (FLX) e haloperidol (HAL) no teste de preferência social. min: 500 ng/L; max: 5000 ng/L. Os dados foram analisados pelo teste ANOVA de uma via seguido pelo teste *post hoc* de Tukey e são apresentados como média ± desvio padrão. *n* = 20, exceto HAL max (n = 19). *p<0,05; ****p<0,0001.

A Figura 16 mostra o mapa de rastreio de 1 animal representativo dos grupos controle, DZP 500 (min) e DZP 5000 (max), permitindo observar claramente a diferença no comportamento de preferência social induzidas pelo DZP.

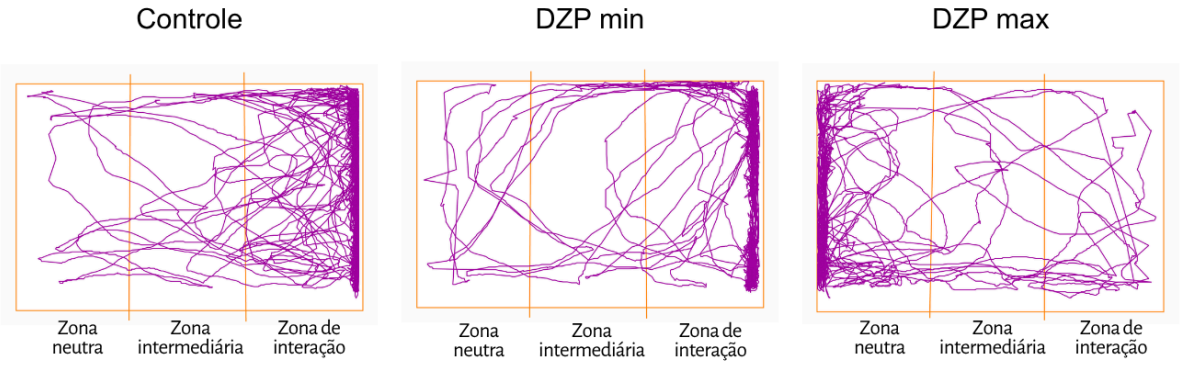


Figura 15. Mapas de rastreio representativos dos efeitos da exposição prolongada a diazepam (DZP) no teste de preferência social. min: 500 ng/L; max: 5000 ng/L. Cada mapa representa a trajetória de um animal representativo por grupo experimental. As linhas verticais delimitam as zonas virtuais neutra, intermediária e de interação utilizadas para a análise comportamental.

A tabela 1 apresenta uma síntese das alterações comportamentais observadas em cada grupo experimental em relação ao grupo controle, indicando o aumento (↑) ou redução (↓) de cada comportamento analisado.

Tabela 1: Síntese dos resultados comportamentais.

EXPOSIÇÃO SUBAGUDA								
Teste	**Parâmetro**	**DZP min**	**DZP max**	**FLX min**	**FLX max**	**HAL min**	**HAL max**	**Interpretação do resultado**
Tanque novo	Tempo na zona superior	-	-	-	-	-	-	Sem alteração comportamental
	Tempo na zona inferior	-	-	-	-	-	-	Sem alteração comportamental
	Distância	-	-	-	-	-	-	Sem alteração comportamental
	Cruzamentos	-	-	-	-	-	-	Sem alteração comportamental
Claro/ Escuro	Tempo na zona clara	-	-	-	↑	-	↑	Redução do comportamento semelhante à ansiedade.
	Cruzamentos	↑	-	-	-	↑	↑	Aumento da atividade exploratória/locomotora ou natação errática.
Preferência social	Tempo na zona interação	-	-	-	-	-	-	Sem alteração comportamental
	Tempo na zona neutra	-	-	-	-	-	-	Sem alteração comportamental

	Distância	-	-	-	-	-	-	Sem alteração comportamental
	Cruzamentos	-	-	-	-	-	-	Sem alteração comportamental
EXPOSIÇÃO PROLONGADA								
Tanque novo	Tempo na zona superior	-	-	-	-	↑	-	Redução do comportamento semelhante à ansiedade.
	Tempo na zona inferior	-	-	-	-	↓	-	Redução do comportamento semelhante à ansiedade.
Claro/ Escuro	Tempo na zona clara	-	-	-	-	-	-	Sem alteração comportamental
	Cruzamentos	-	-	-	-	-	-	Sem alteração comportamental
Preferência social	Tempo na zona interação	-	↓	-	-	-	-	Redução da preferência social.
	Tempo na zona neutra	-	↑	-	-	-	-	Redução da preferência social.
	Distância	↓	-	-	-	-	-	Redução da atividade locomotora.

DZP: diazepam; **FLX**: fluoxetina; **HAL**: haloperidol; **max**: máxima; **min**: mínima. **(↑)** aumento; **(↓)** redução; **(-)** sem alteração.

5 DISCUSSÃO

A presença de psicofármacos em corpos d'água tem se tornado uma preocupação crescente devido ao aumento do consumo dessas substâncias, ao descarte inadequado e à remoção incompleta em estações de tratamento de água. Esse tipo de substância age no sistema nervoso central e, mesmo em concentrações mínimas, pode ser ambientalmente relevante, pois interfere em vias neuroquímicas e provoca alterações em inúmeros organismos aquáticos (Schuijt *et al.*, 2024; Magno *et al*., 2015). Nesse contexto, o peixe-zebra (*Danio rerio*) representa um modelo ideal para estudos de ecotoxicologia, por ser um excelente bioindicador ambiental e apresentar homologia genética de aproximadamente 70% com o ser humano (Howe *et al*., 2013).

Dessa forma, o peixe-zebra foi utilizado como modelo animal no presente estudo, a fim de avaliar os efeitos comportamentais e moleculares após a exposição subaguda e prolongada a concentrações ambientalmente relevantes de diazepam

(DZP), fluoxetina (FLX) e haloperidol (HAL). Os resultados dos testes comportamentais indicam alterações dependentes do tempo de exposição e do mecanismo de ação farmacológico de cada psicofármaco, em que os efeitos mais evidentes foram nos parâmetros relacionados ao comportamento semelhante à ansiedade após a exposição subaguda e prolongada e no comportamento social após a exposição prolongada.

5.1 Exposição subaguda

No protocolo de exposição subaguda, os efeitos observados foram em relação aos parâmetros locomotores e exploratórios e ao comportamento semelhante à ansiedade, avaliados pelo teste de tanque novo e pelo teste claro/escuro.

A exposição subaguda à DZP, FLX e HAL não gerou nenhum resultado significativo comparado ao grupo controle para os parâmetros avaliados no teste do tanque novo. No entanto, no teste claro/escuro, os grupos FLX 5000 ng/L e HAL 5000 ng/L apresentaram aumento significativo no tempo na zona clara em relação ao grupo controle, sugerindo efeito ansiolítico e maior comportamento exploratório após a exposição subaguda. Esses resultados corroboram o achado de Magno *et al*. (2015), no qual a exposição aguda por 5 minutos ao haloperidol nas concentrações de 1 a 2 mg/L reduziu o tempo no escuro em peixes-zebra no teste claro/escuro, o que demonstra que esse efeito pode ser observado em concentrações ainda menores.

Embora esse padrão possa ser interpretado como ansiolítico, ecotoxicologicamente ele representa uma quebra da escototaxia, comprometendo a avaliação de ameaças e aumentando a vulnerabilidade do animal no ambiente (Magno *et al.*, 2015). No estudo de Fontana, Alnassar e Parker (2022) a exposição de peixes-zebra adultos à FLX em uma concentração muito mais alta do que as utilizadas no presente estudo (100 µg/L) também promoveu aumento no tempo de permanência dos animais na zona clara, corroborando os resultados do presente estudo. Além disso, o estudo de Vera-Chang, Moon e Trudeau (2019) demonstrou que, após a exposição de 6 dias à FLX nas concentrações de 0,54 µg/L e 54 µg/L, durante o desenvolvimento inicial do peixe-zebra, houve redução do estresse, efeito que persistiu por quatro gerações. Esses achados são preocupantes, pois sugerem

que psicofármacos presentes no ambiente podem impactar não apenas os organismos diretamente expostos, mas também suas futuras gerações.

Em relação aos parâmetros locomotores, ainda no teste claro/escuro, os grupos DZP 500 ng/L e HAL 500 e 5000 ng/L aumentaram o número de cruzamentos em relação ao grupo controle, sugerindo maior atividade locomotora. Embora o DZP e o HAL sejam fármacos sedativos/depressores no uso clínico, o aumento na locomoção observado corrobora os achados de Irons *et al.* (2013) e Bruni *et al.* (2016), que demonstraram que baixas concentrações de haloperidol após uma exposição aguda geram hiperatividade em larvas do peixe-zebra, diferentemente da sedação causada por concentrações maiores. Segundo Leonardos *et al*. (2025), essa agitação paradoxal inicial é desencadeada pelo bloqueio preferencial dos autorreceptores D_2 pré-sinápticos, o que inunda a fenda sináptica com dopamina, podendo inclusive induzir surtos de natação errática (Magno *et al.*, 2015), o que também pode explicar o aumento no número de cruzamentos observado.

Por fim, neste estudo, após a exposição subaguda, não houve diferenças significativas entre os fármacos e o grupo controle para nenhum dos parâmetros avaliados, especialmente nos que medem exclusivamente a preferência social, como tempo na zona de interação e tempo na zona neutra.

5.2 Exposição prolongada

O protocolo de exposição prolongada demonstrou que a presença contínua de fármacos na água afetou comportamentos complexos de sobrevivência. Os principais efeitos observados foram em relação aos parâmetros de comportamento semelhante à ansiedade e ao comportamento social, encontrados nos testes de tanque novo e de preferência social.

No teste do tanque novo, após a exposição prolongada, o grupo HAL 500 ng/L teve o tempo na zona superior do tanque significativamente aumentado, consequentemente, o tempo na zona inferior do aquário diminuiu em relação ao grupo controle. Esse resultado indica que HAL 500 ng/L reduziu o comportamento semelhante à ansiedade, revelado pela alteração no comportamento de geotaxia, um comportamento de evitação de risco, assim como demonstrado no grupo controle (Egan *et al.*, 2009). A exposição prolongada ao antipsicótico aumentou o

tempo de exploração da superfície do tanque de teste, que, na natureza, pode ser fatal, visto que aumenta a suscetibilidade à predação.

Em relação a alterações locomotoras, o efeito mais significativo observado no protocolo de exposição prolongada foi no teste de preferência social, no qual o grupo DZP 500 ng/L apresentou uma redução acentuada na distância percorrida em relação ao grupo controle. O fato de a menor concentração provocar efeitos mais pronunciados que a maior pode estar relacionado ao padrão de resposta não monotônica descrito para esse fármaco em peixe-zebra, caracterizado por uma curva dose-resposta em formato de “U”, fenômeno ecotoxicológico chamado de hormese. Nesse padrão, baixas concentrações podem desencadear efeitos mais acentuados, os quais tendem a diminuir em concentrações mais elevadas (Bencan, Sledge e Levin, 2009; Kalichak *et al.*, 2016).

Na exposição prolongada, a redução locomotora observada em 500 ng/L pode estar relacionada à manutenção da inibição GABAérgica induzida por DZP, enquanto a ausência da hipoatividade em 5000 ng/L sugere ativação de mecanismos compensatórios no sistema nervoso (Wu *et al.,* 2020). O estudo de Markin e seus colaboradore (2021) indica que a exposição contínua de embriões e larvas de peixe-zebra ao DZP por 4 dias nas concentrações de 0,8 µg/L a 160 µg/L pode promover hiperativação de vias excitatórias, incluindo aumento da sinalização do ácido aspártico (Markin *et al.,* 2021), além de alterações relacionadas ao glutamato e à glutamina cerebrais (Zhang *et al.,* 2024). Dessa forma, a ausência da redução da locomoção em concentrações mais altas não necessariamente indica menor toxicidade, mas sim um estado compensatório em que o sistema nervoso tenta contrabalançar os efeitos sedativos dos benzodiazepínicos.

Já no teste de preferência social, os resultados do presente estudo demonstraram que o grupo DZP 5000 ng/L apresentou uma redução no tempo gasto na zona de interação e um aumento do tempo gasto na zona neutra em comparação ao grupo controle. O estudo de Chen *et al.* (2021) também realizou uma exposição prolongada de 21 dias em peixes-zebra adultos a concentrações subletais de 12 µg/L e 120 µg/L, e encontrou resultados semelhantes para o DZP, em que o grupo exposto passou mais tempo na zona neutra. Além disso, foi observado que a exposição ao psicofármaco afetou as fêmeas de maneira mais severa que os machos, prejudicando o cortejo e a reprodução. Tais resultados são preocupantes,

visto que representam um duplo risco biológico: a perda da defesa coletiva do cardume e a redução no sucesso reprodutivo da espécie.

Esse déficit social também pode estar relacionado aos efeitos neurotóxicos do DZP sobre o sistema visual. A exposição crônica ao fármaco pode comprometer a fototransdução, por meio da sub expressão de genes relacionados a essa via no cérebro e no sistema visual, e, consequentemente, prejudicar o reconhecimento social na espécie, reduzindo o comportamento de aproximação de cardume (Zhang *et al.*, 2024).

5.3 Principais achados nos diferentes tempos de exposição

As exposições subaguda e prolongada provocaram diferentes alterações comportamentais em peixe-zebra. No que tange ao comportamento semelhante à ansiedade, a exposição subaguda à FLX reduziu esse comportamento no teste claro/escuro quando comparado ao grupo controle, o que não foi observado após a exposição prolongada. Esse retorno aos níveis basais do comportamento de escototaxia sugere um processo de tolerância fisiológica e neuroadaptação, no qual a manutenção da homeostase diante da exposição contínua a esses fármacos pode induzir a dessensibilização (*downregulation*) de receptores serotoninérgicos, a fim de se proteger do excesso de serotonina acumulado pelo bloqueio constante dos transportadores pré-sinápticos (Stewart *et al.*, 2014; Zhang *et al*., 2022; Schuijt *et al.*, 2024).

Em contrapartida, após a exposição prolongada ao HAL o peixe-zebra apresentou redução do comportamento semelhante à ansiedade no teste do tanque novo, efeito que não foi observado após a exposição subaguda. Essa diferença entre os tempos de exposição pode ser atribuída à farmacocinética do haloperidol e à sua elevada capacidade de bioacumulação em peixes (Escudero *et al*., 2021; Chiejina *et al*., 2022). Enquanto a exposição subaguda parece ser insuficiente para comprometer o comportamento geotáxico, a exposição prolongada promove o acúmulo progressivo do fármaco e de seus metabólitos, intensificando o bloqueio dopaminérgico. Como consequência, ocorre prejuízo da avaliação de risco e redução da aversão ao ambiente novo, levando os animais a explorar precocemente a região superior do tanque, um comportamento que pode aumentar sua vulnerabilidade à predação em condições naturais (Magno *et al.*, 2015).

Já em relação ao teste de preferência social, a exposição prolongada à DZP reduziu o comportamento social observado pela redução do tempo na zona de interação, efeito que não foi observado após a exposição subaguda. Um estudo anterior demonstrou que os DZP reduzem a coesão do cardume após poucos minutos de exposição aguda (Gebauer *et al.,* 2011), que constitui um efeito farmacológico característico dos benzodiazepínicos. Essas diferentes respostas farmacológicas dependentes do tempo de exposição podem estar relacionadas à plasticidade do sistema nervoso e à farmacocinética do diazepam. O efeito de redução da coesão de cardume após exposição aguda descrito por Gebauer e colaboradores (2011) não foi observado após a exposição subaguda, entretanto, esse efeito foi observado após exposição prolongada nesse estudo. Isso pode indicar que o benzodiazepínicos podem promover efeitos iniciais que cessam após mecanismos de neuroadaptação durante a exposição subaguda, contudo, depois de uma exposição prolongada a bioacumulação leva a sobrecarga farmacológica e parece superar os mecanismos compensatórios do organismo, culminando no déficit de sociabilidade observado após 28 dias (Xiao *et al*., 2026).

5.4 Implicações ecotoxicológicas

A presença de psicofármacos no ambiente aquático pode afetar diferentes estágios do desenvolvimento e comprometer múltiplos processos fisiológicos em organismos aquáticos. Em peixes-zebra, por exemplo, o HAL apresentou toxicidade significativa durante o desenvolvimento embrio-larval, promovendo alterações morfológicas, cardiovasculares e comportamentais (Leonardos *et al.*, 2025). Entretanto, os efeitos decorrentes da presença contínua desses contaminantes ainda são subestimados, uma vez que a maioria dos estudos ecotoxicológicos avalia apenas exposições agudas ou subagudas. Considerando que as tecnologias atuais de tratamento de efluentes ainda apresentam baixa eficiência na remoção desses compostos, os psicofármacos permanecem continuamente disponíveis no ambiente aquático, favorecendo exposições prolongadas e processos de bioacumulação.

Os efeitos observados no presente estudo não representam uma vulnerabilidade isolada do peixe-zebra, já que sistemas neurotransmissores, como os serotoninérgicos e GABAérgicos, são amplamente conservados entre espécies

aquáticas. A literatura demonstra que a fluoxetina pode comprometer a reprodução de moluscos, como o mexilhão-zebra *Dreissena polymorpha* (Giebułtowicz e Nałęcz-Jawecki, 2014), além de prejudicar a evasão de predadores em peixes como *Pimephales promelas* (Painter *et al*., 2009; Magno *et al*., 2015). Da mesma forma, o diazepam altera o comportamento fototático de *Daphnia magna (*Cunha, Mendes e Marques, 2019), enquanto o haloperidol promove hiperatividade, alterações locomotoras e perda de equilíbrio em outras espécies de peixes (Chiejina *et al*, 2022). Esses achados reforçam que os psicofármacos podem comprometer parâmetros fundamentais para a sobrevivência, reprodução e manutenção da dinâmica populacional aquática.

Além disso, concentrações mais elevadas desses compostos têm sido descritas em efluentes hospitalares e industriais, ampliando os impactos ecotoxicológicos sobre os ecossistemas aquáticos (Nguyen *et al.,* 2024; Sharma *et al*., 2024). Estudos de campo já demonstraram bioacumulação de diazepam e outros psicofármacos em tecidos de peixes-zebra e peixes selvagens, evidenciando o potencial de transferência desses contaminantes ao longo da cadeia trófica (Ivankovic *et al*., 2024; Cerveny *et al.*, 2021). Esse cenário é particularmente preocupante, considerando que resíduos de fármacos e metabólitos já foram detectados em água potável (Zhen *et al*., 2018; Giebułtowicz e Nałęcz-Jawecki, 2014, Bruce, Pleus e Snyder, 2010). Dessa forma, contaminantes emergentes devem ser tratados como um problema relevante de saúde ambiental e pública, reforçando a necessidade de novos estudos sobre toxicidade crônica e do desenvolvimento de tecnologias mais eficientes para remoção desses compostos das águas residuais.

5.5 Limitações e perspectivas

O presente estudo apresenta algumas limitações metodológicas que devem ser consideradas na interpretação dos resultados. Primeiramente, os animais não foram separados por sexo, impossibilitando a avaliação de possíveis diferenças entre machos e fêmeas na resposta aos psicofármacos, especialmente em parâmetros neurocomportamentais e endócrinos.

Outra limitação importante refere-se à impossibilidade de determinar precisamente a quantidade de fármaco absorvida individualmente por cada

organismo ao longo da exposição. Dessa forma, os efeitos observados refletem a exposição às concentrações utilizadas na água, não sendo possível estabelecer diretamente a carga corporal acumulada pelos animais. No entanto, o uso de concentrações ambientalmente relevantes representa um importante ponto forte do estudo, uma vez que aumenta a aplicabilidade ecotoxicológica dos achados e aproxima o modelo experimental das condições reais encontradas em ecossistemas aquáticos contaminados.

Além disso, é importante salientar que as alterações comportamentais observadas podem ter sido influenciadas por mecanismos *off target*, decorrentes de interações com alvos biológicos distintos dos alvos primários (Irons *et al*., 2013; Leonardos *et al*., 2025). No caso do haloperidol, antagonista dos receptores dopaminérgicos D2, a agitação paradoxal observada nas fases iniciais da exposição parece envolver mecanismos independentes da neurotransmissão dopaminérgica, estando associada ao bloqueio dos canais de potássio do tipo ERG, cuja inibição também é reconhecida por favorecer o prolongamento do intervalo QT cardíaco (Leonardos *et al.,* 2025). Em relação ao diazepam, apesar de seu mecanismo de ação estar predominantemente relacionado à modulação dos receptores $GABA_A$, análises metabolômicas indicam que exposições de curto e médio prazo promovem importantes alterações secundárias em vias neuroquímicas envolvendo os sistemas serotoninérgico, dopaminérgico, adrenérgico e o metabolismo do ácido aspártico (Markin *et al*., 2021).

Como perspectivas, estudos adicionais podem investigar diferenças sexuais na susceptibilidade aos psicofármacos, além de incorporar análises bioquímicas e moleculares para melhor compreensão dos mecanismos envolvidos nas alterações comportamentais observadas. Também são necessários estudos multigeracionais e de exposição combinada entre diferentes contaminantes emergentes, considerando que os organismos aquáticos estão expostos simultaneamente a múltiplos compostos no ambiente. Por fim, a quantificação tecidual dos fármacos e a avaliação de processos de bioacumulação podem contribuir para maior compreensão dos impactos ecotoxicológicos crônicos desses contaminantes.

6 CONCLUSÃO

A exposição aos psicofármacos diazepam (DZP), fluoxetina (FLX) e haloperidol (HAL) induziu alterações significativas no comportamento inato do peixe-zebra, incluindo modificações locomotoras, exploratórias, sociais e redução do comportamento semelhante à ansiedade. Essas alterações podem comprometer funções ecológicas essenciais, como evitação de predadores, interação social e manutenção da dinâmica populacional das espécies aquáticas.

Os resultados obtidos reforçam a relevância ecotoxicológica dos psicofármacos como contaminantes emergentes, especialmente considerando que as concentrações utilizadas são compatíveis com aquelas já detectadas no ambiente aquático. Além disso, os achados evidenciam a necessidade do descarte adequado de medicamentos e do desenvolvimento de tecnologias mais eficientes para remoção desses compostos das águas residuais, visando minimizar impactos sobre os ecossistemas aquáticos e, consequentemente, sobre a saúde ambiental e humana.

REFERÊNCIAS

ABREU, M. S. DE et al. Diazepam and Fluoxetine Decrease the Stress Response in Zebrafish. **PLoS ONE**, v. 9, n. 7, p. e103232, 23 jul. 2014.

ARGALUZA, J. et al. Environmental pollution with psychiatric drugs. **World Journal of Psychiatry**, v. 11, n. 10, p. 791–804, 19 out. 2021.

BENCAN, Zachary; SLEDGE, Damiyon; LEVIN, Edward D. Buspirone, chlordiazepoxide and diazepam effects in a zebrafish model of anxiety. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 94, n. 1, p. 75–80, nov. 2009.

BENVENUTTI, Radharani *et al.* How do zebrafish (*Danio rerio*) respond to MK‐801 and amphetamine? Relevance for assessing schizophrenia‐related endophenotypes in alternative model organisms. **Journal of Neuroscience Research**, v. 99, n. 11, p. 2844–2859, nov. 2021.

BRASIL. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). **Resolução Normativa nº 30, de 02 de fevereiro de 2016. Baixa a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica** - DBCA. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, p. 3, 3 fev. 2016

BRASIL. **Resolução CONCEA no 61, de 02 de maio de 2023. Dispõe sobre as condições que deverão ser observadas para a criação, a manutenção e a experimentação com peixes mantidos em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica**. Disponível em: <https://www.in.gov.br/web/dou>. Acesso em: 28 abril. 2026.

BENOTTI, Mark J. *et al.* Pharmaceuticals and Endocrine Disrupting Compounds in U.S. Drinking Water. **Environmental Science & Technology**, v. 43, n. 3, p. 597–603, 1 fev. 2009.

BRAUER, Ruth *et al.* Psychotropic medicine consumption in 65 countries and regions, 2008–19: a longitudinal study. **The Lancet Psychiatry**, v. 8, n. 12, p. 1071–1082, dez. 2021.

BRODIN, T. *et al*. Ecological effects of pharmaceuticals in aquatic systems—impacts through behavioural alterations. **Philosophical Transactions of the Royal Society**, v. 369, 20130580 , 2014.

BRUCE, Gretchen M.; PLEUS, Richard C.; SNYDER, Shane A. Toxicological Relevance of Pharmaceuticals in Drinking Water. **Environmental Science & Technology**, v. 44, n. 14, p. 5619–5626, 15 jul. 2010.

BRUNI, Giancarlo *et al.* Zebrafish behavioral profiling identifies multitarget antipsychotic-like compounds. **Nature Chemical Biology**, v. 12, n. 7, p. 559–566, jul. 2016.

CALDAS, Sergiane Souza *et al.* Multi-residue method for determination of 58 pesticides, pharmaceuticals and personal care products in water using solvent

demulsification dispersive liquid–liquid microextraction combined with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 146, p. 676–688, jan. 2016.

CERVENY, Daniel *et al.* Neuroactive drugs and other pharmaceuticals found in blood plasma of wild European fish. **Environment International**, v. 146, p. 106188, jan. 2021.

CHEN, Kun *et al.* Impacts of chronic exposure to sublethal diazepam on behavioral traits of female and male zebrafish (*Danio rerio*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 208, p. 111747, jan. 2021.

*CHIA, Kelda et al. Zebrafish as a model organism for neurodegenerative disease. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 15, p. 940484, 13 out. 2022.*

CHIEJINA, Chike Obinna *et al.* Haloperidol alters the behavioral, hematological and biochemical parameters of freshwater African catfish, Clarias gariepinus (Burchell 1822). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 254, p. 109292, abr. 2022.

CUNHA, Deivisson L.; MENDES, Maíra P.; MARQUES, Marcia. Environmental risk assessment of psychoactive drugs in the aquatic environment. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 1, p. 78–90, jan. 2019.

DE ALMEIDA, Carlos *et al.* Determination of anti-anxiety and anti-epileptic drugs in hospital effluent and a preliminary risk assessment. **Chemosphere**, v. 93, n. 10, p. 2349–2355, nov. 2013.

DE ALMEIDA, C.A.A., Oliveira, M.S., Mallmann, C.A., Martins, A.F., 2015. Determination of the psychoactive drugs carbamazepine and diazepam in hospital effluent and identifica-tion of their metabolites. **Environ. Sci. Pollut.** Res. 22, 17192–17201. https://doi.org/ 10.1007/s11356-015-4948-y.

EGAN, R. J. et al. Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. **Behavioural Brain Research**, v. 205, n. 1, p. 38–44, dez. 2009.

ENGESZER, Raymond E.; RYAN, Michael J.; PARICHY, David M. Learned Social Preference in Zebrafish. **Current Biology**, v. 14, n. 10, p. 881–884, maio 2004.

ESCUDERO, J. *et al.* Antipsychotics as environmental pollutants: An underrated threat? **Science of The Total Environment**, v. 769, p. 144634, maio 2021.

FERNANDES, Joana P. *et al.* Pharmaceutical Compounds in Aquatic Environments—Occurrence, Fate and Bioremediation Prospective. **Toxics**, v. 9, n. 10, p. 257, 9 out. 2021.

FONTANA, Barbara D.; ALNASSAR, Nancy; PARKER, Matthew O. The zebrafish (*Danio rerio*) anxiety test battery: comparison of behavioral responses in the novel tank diving and light–dark tasks following exposure to anxiogenic and anxiolytic compounds. **Psychopharmacology**, v. 239, n. 1, p. 287–296, jan. 2022.

FORMAGINI, Luana *et al.* Psychotropic pharmaceuticals in aquatic environments: Occurrence and analytical challenges. **Science of The Total Environment**, v. 998, p. 180269, 10 out. 2025.

GEBAUER, Daiane L. *et al.* Effects of anxiolytics in zebrafish: similarities and differences between benzodiazepines, buspirone and ethanol. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 99, n. 3, p. 480–486, set. 2011.

GIACOMINI, Ana Cristina V. V. *et al.* Fluoxetine and diazepam acutely modulate stress induced-behavior. **Behavioural Brain Research**, v. 296, p. 301–310, jan. 2016.

GIEBUŁTOWICZ, Joanna; NAŁĘCZ-JAWECKI, Grzegorz. Occurrence of antidepressant residues in the sewage-impacted Vistula and Utrata rivers and in tap water in Warsaw (Poland). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 104, p. 103–109, jun. 2014.

GOMES, Marcelo Pedrosa; GOMES, Lorena Pedrosa. Tracking the surge of psychiatric pharmaceuticals in urban rivers of Curitiba amidst and beyond the SARS-CoV-2 pandemic. **Science of The Total Environment**, v. 954, p. 176685, 1 dez. 2024.

GUNNARSSON, L. et al. Evolutionary conservation of human drug targets in organisms used for environmental risk assessments. **Environmental Science & Technology**, v. 42, n. 15, p. 5807–5813, 1 ago. 2008.

HAMA AZIZ, Kosar Hikmat *et al.* Pharmaceutical pollution in the aquatic environment: advanced oxidation processes as efficient treatment approaches: a review. **Materials Advances**, v. 6, n. 11, p. 3433–3454, 2025.

HEDGESPETH, M. L.; NILSSON, P. A.; BERGLUND, O. Ecological implications of altered fish foraging after exposure to an antidepressant pharmaceutical. **Aquatic Toxicology** (Amsterdam, Netherlands), v. 151, p. 84–87, jun. 2014.

HOLMBERG, A. et al. Does waterborne citalopram affect the aggressive and sexual behaviour of rainbow trout and guppy. **Journal of hazardous materials**, v. 187, n. 1–3, p. 596–599, 1 mar. 2011.

HOWE, K. et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 498–503, 25 abr. 2013.

HUANG, Caige *et al.* Psychotropic medication consumption before and after onset of COVID-19 pandemic in 91 countries and regions: a time-series analysis. **The Lancet Regional Health - Western Pacific**, v. 64, p. 101711, nov. 2025.

HUGHES, Stephen R.; KAY, Paul; BROWN, Lee E. Global Synthesis and Critical Evaluation of Pharmaceutical Data Sets Collected from River Systems. **Environmental Science & Technology**, v. 47, n. 2, p. 661–677, 15 jan. 2013.

INSEL, T. R. *et al.* Innovative solutions to novel drug development in mental health. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 37, n. 10, p. 2438–2444, dez. 2013.

IRONS, T. D. *et al.* Acute administration of dopaminergic drugs has differential effects on locomotion in larval zebrafish. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 103, n. 4, p. 792–813, 2013.

IVANKOVIC, Klaudija *et al.* Uptake/depuration kinetics, bioaccumulation potential and metabolic transformation of a complex pharmaceutical mixture in zebrafish (*Danio rerio*). **Journal of Hazardous Materials**, v. 470, p. 134144, maio 2024.

KALICHAK, Fabiana *et al.* Waterborne psychoactive drugs impair the initial development of Zebrafish. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 41, p. 89–94, jan. 2016.

KALUEFF, A. V. *et al.* Towards a comprehensive catalog of zebrafish behavior 1.0 and beyond. **Zebrafish**, v. 10, n. 1, p. 70–86, 2013.

KHAN, Afzal Husain *et al.* Effect of seasonal variation on the occurrences of high-risk pharmaceutical in drain-laden surface water: A risk analysis of Yamuna River. **Science of The Total Environment**, v. 794, p. 148484, nov. 2021.

KINRYS, G. et al. Medication disposal practices: Increasing patient and clinician education on safe methods. **The Journal of International Medical Research**, v. 46, n. 3, p. 927–939, mar. 2018.

KONDOR, Attila Csaba *et al.* Occurrence of pharmaceuticals in the Danube and drinking water wells: Efficiency of riverbank filtration. **Environmental Pollution**, v. 265, p. 114893, out. 2020.

LAJEUNESSE, A., Gagnon, C., Sauvé, S., 2008. Determination of basic antidepressants and their N-Desmethyl metabolites in raw sewage and wastewater using solid-phase extraction and liquid chromatography−tandem mass spectrometry. **Anal. Chem.** 80 (14), 5325–5333.

LAN, SM *et al.* Occurrence of selected pharmaceuticals in industrial wastewater, receiving waters and fish. **African Journal of Aquatic Science**, v. 44, n. 4, p. 401–408, 6 dez. 2019.

LEONARDOS, Maximos *et al.* The Developmental Toxicity of Haloperidol on Zebrafish (*Danio rerio*) Embryos. **Biomedicines**, v. 13, n. 8, p. 1794, 22 jul. 2025.

LEVIN, Edward D.; BENCAN, Zachary; CERUTTI, Daniel T. Anxiolytic effects of nicotine in zebrafish. **Physiology & Behavior**, v. 90, n. 1, p. 54–58, 30 jan. 2007.

LINDBERG, R. H. *et al*. Occurrence and behaviour of 105 active pharmaceutical ingredients in sewage waters of a municipal sewer collection system. **Water Research**, v. 58, p. 221-229, 2014

MAGNO, Lílian Danielle Paiva *et al.* Pharmacological study of the light/dark preference test in zebrafish (*Danio rerio*): Waterborne administration. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 135, p. 169–176, ago. 2015

MARKIN, Pavel A. *et al*. Short- and medium-term exposures of diazepam induce metabolomic alterations associated with the serotonergic, dopaminergic, adrenergic

and aspartic acid neurotransmitter systems in zebrafish (*Danio rerio*) embryos/larvae. **Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics**, v. 38, p. 100816, 2021.

MAXIMINO, C.; DA SILVA, A. W. B.; GOUVEIA JR., A.; HERCULANO, A. M. Pharmacological analysis of zebrafish (*Danio rerio*) scototaxis. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 35, p. 624-631, 2011.

MAXIMINO, C. *et al*. Role of serotonin in zebrafish (*Danio rerio*) anxiety: relationship with serotonin levels and effect of buspirone, WAY 100635, SB 224289, fluoxetine and para-chlorophenylalanine (pCPA) in two behavioral models. **Neuropharmacology**, v. 71, p. 83-97, 2013.

MAXIMINO, C. *et al*. Scototaxis as anxiety-like behavior in fish. **Nature Protocols**, 2010. Disponível em: https://www.nature.com/articles/nprot.2009.225. Acesso em: 8 jul. 2026.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI). **PubChem Database**. Bethesda, MD, USA. Disponível em: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/. Acesso em: 20 de maio de 2026.

NATIONAL INSTITUTE OF MENTAL HEALTH. **Mental Illness, 2020**. Disponível em: <https://www.nimh.nih.gov/health/statistics/mental-illness>. Acesso em: 7 jun. 2025.

NGUYEN, Minh-Ky *et al.* Occurrence and fate of pharmaceutical pollutants in wastewater: Insights on ecotoxicity, health risk, and state–of–the-art removal. **Chemosphere**, v. 354, p. 141678, abr. 2024.

PAINTER, M. M. et al. Antidepressants at environmentally relevant concentrations affect predator avoidance behavior of larval fathead minnows (Pimephales promelas). **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 28, n. 12, p. 2677, 2009.

PENG, Y.; GAUTAM, L.; HALL, S. The detection of drugs of abuse and pharmaceuticals in drinking water using solid-phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry. **Chemosphere**, v. 223, p. 438-447, 2019.

PIVETTA, Rhannanda Copetti *et al.* Tracking the occurrence of psychotropic pharmaceuticals in Brazilian wastewater treatment plants and surface water, with assessment of environmental risks. **Science of The Total Environment**, v. 727, p. 138661, 20 jul. 2020.

PURI, Mehak; GANDHI, Kavita; KUMAR, M. Suresh. Emerging environmental contaminants: A global perspective on policies and regulations. **Journal of Environmental Management**, v. 332, p. 117344, abr. 2023.

REICHERT, Jaqueline F.; SOUZA, Darliana M.; MARTINS, Ayrton F. Antipsychotic drugs in hospital wastewater and a preliminary risk assessment. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 170, p. 559–567, 15 abr. 2019.

RITTER, James M.; FLOWER, Rod; Graeme Henderson; et al. **Rang & Dale Farmacologia.** 10. ed. Rio de Janeiro: GEN Guanabara Koogan, 2025. E-book. p.Capa. ISBN 9786561110228. Disponível em:

https://integrada.minhabiblioteca.com.br/reader/books/9786561110228/. Acesso em: 24 abr. 2026.

SALARI, Nader *et al.* The prevalence of stress, anxiety and depression within front-line healthcare workers caring for COVID-19 patients: a systematic review and meta-regression. **Human Resources for Health**, v. 18, n. 1, p. 100, dez. 2020.

SALGADO, R. *et al.* Assessing the diurnal variability of pharmaceutical and personal care products in a full-scale activated sludge plant. **Environmental Pollution**, v. 159, n. 10, p. 2359–2367, out. 2011.

SCHUIJT, Lara M. *et al.* Effects of antidepressant exposure on aquatic communities assessed by a combination of morphological identification, functional measurements, environmental DNA metabarcoding and bioassays. **Chemosphere**, v. 349, p. 140706, fev. 2024.

SHARMA, Charu *et al.* Hospital-associated effluents: the masked environmental threat that needs urgent attention and action. **Discover Applied Sciences**, v. 7, n. 1, p. 40, 23 dez. 2024.

SILVA, L. J. G. et al. SSRIs antidepressants in marine mussels from Atlantic coastal areas and human risk assessment. **The Science of the Total Environment**, v. 603–604, p. 118–125, 1 dez. 2017.

SIM, W.-J. et al. Occurrence and distribution of pharmaceuticals in wastewater from households, livestock farms, hospitals and pharmaceutical manufactures. **Chemosphere**, v. 82, n. 2, p. 179–186, jan. 2011.

STEWART, A. M. *et al*. Zebrafish models for translational neuroscience research: from tank to bedside. **Trends in Neurosciences**, v. 37, n. 5, p. 264-278, 2014.

VALADAS, J., et al. Ochratoxin A induces behavioral and neurochemical changes in adult zebrafish. **bioRxiv**, 19 out. 2021.

VALADAS, J., et al. Propiconazole induces abnormal behavior and oxidative stress in zebrafish. **Environmental Science and Pollution Research International**, v. 26, n. 27, p.27808–27815, set. 2019.

VERA-CHANG, Marilyn N.; MOON, Thomas W.; TRUDEAU, Vance L. Ancestral Fluoxetine Exposure Sensitizes Zebrafish to Venlafaxine-Induced Reductions in Cortisol and Spawning. **Endocrinology**, v. 160, n. 9, p. 2137–2142, 1 set. 2019.

VILLENEUVE, D. L. et al. Effects of a dopamine receptor antagonist on fathead minnow dominance behavior and ovarian gene expression in the fathead minnow and zebrafish. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 73, n. 4, p. 478–485, maio 2010.

WINKLER, P. *et al.* Increase in prevalence of current mental disorders in the context of COVID-19: analysis of repeated nationwide cross-sectional surveys. **Epidemiology and Psychiatric Sciences**, v. 29, p. e173, 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Mental Health and COVID-19**: Early evidence of the pandemic's impact. Scientific brief. [S. l.]: World Health Organization, 2 mar. 2022. WHO reference number: WHO/2019-nCoV/Sci_Brief/Mental_health/2022.1.

WU, Min *et al.* Short-term and persistent impacts of sublethal exposure to diazepam on behavioral traits and brain GABA levels in juvenile zebrafish (*Danio rerio*). **Science of The Total Environment**, v. 740, p. 140392, out. 2020.

Xiao, H.-L., S.-T.Li, T.-T.Li, L.Xin, X.-P.Liao e D.-H.Zhao. 2026. “Farmacocinética e eliminação de resíduos de diazepam em peixe-zebra.” **Jornal de Farmacologia Veterinária e Terapêutica** 1–9. https://doi.org/10.1111/jvp.70044 .

ZHANG, M. *et al*. Sorption of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) from water and wastewater by carbonaceous materials: a review. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 52, n. 5, p. 727-766, 2022.

ZHANG, J. *et al*. Removal of emerging contaminants (ECs) from aqueous solutions by modified biochar: a review. **Chemical Engineering Journal**, v. 479, p. 147615, 2024

ZHEN, Huajun *et al.* Assessing the impact of wastewater treatment plant effluent on downstream drinking water-source quality using a zebrafish (*Danio rerio*) liver cell-based metabolomics approach. **Water Research**, v. 145, p. 198–209, nov. 2018.

Anexo I: Parecer técnico CEUA: Psicofármacos em concentrações ambientalmente relevantes induzem alterações comportamentais em peixes-zebra (*Danio rerio*).

Universidade Federal do Triângulo Mineiro
Comissão de Ética no Uso de Animais
R. Conde Prados, nº 191 - Bairro Abadia Uberaba/MG CEP 38025-260
(34) 3700-6802 E-mail: ceua@uftm.edu.br

Uberaba, 23 de maio de 2025

PARECER Nº	**22/2025/CEUA/PROPPG**
PROCESSO Nº	23085.003474/2025-82
INTERESSADO:	MATHEUS MARCON
ASSUNTO:	**Parecer técnico: "Avaliação dos efeitos de psicofármacos encontrados em corpos d'água em peixes-zebra (*Danio rerio*)".**

Certificamos que a proposta intitulada **"Avaliação dos efeitos de psicofármacos encontrados em corpos d'água em peixes-zebra (*Danio rerio*)"**, registrada com o **23085.003474/2025-82**, sob a responsabilidade de Matheus Marcon – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, em reunião de **23/05/2025.**

Após a conclusão dos experimentos pilotos e a emissão da capacitação específica dos envolvidos, os respectivos comprovantes deverão ser inseridos no processo para validação pela coordenação/secretaria, possibilitando assim a liberação da quantidade remanescente de animais autorizada no projeto.

Finalidade	Projeto Piloto (treinamento específico)
Espécie/Linhagem/Raça	Peixe-zebra (*Danio rerio*)/ Wild-type
Nº de animais	10
Peso/idade	350mg/3 meses
Gênero	5 machos/ 5 fêmeas
Origem	Alfa Peixes (Juliana Soares de Oliveira Eirelli, Avenida Prudente de Morais, 765-B. Nossa Senhora da Abadia, CNPJ 32.310.903/0001-65)
Treinamento específico dos colaboradores	- Paula Pinheiro Teixeira; - Roberta da Silva Carneiro.

Finalidade	( ) Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	12/08/2025 à 31/12/2026
Espécie/Linhagem/Raça	Peixe-zebra (*Danio rerio*)/ Wild-type
Nº de animais	280
Peso/idade	350mg/3 meses
Gênero	140 machos/140 fêmeas
Origem	Alfa Peixes (Juliana Soares de Oliveira Eirelli, Avenida Prudente de Morais, 765-B. Nossa Senhora da Abadia, CNPJ 32.310.903/0001-65)

Segue abaixo a relação de todos os envolvidos e as respectivas funções no referido projeto:

Responsável	**Funções no projeto**
Matheus Marcon	Planejamento e supervisão; manipulação; monitoramento do bem-estar animal; teste físico e/ou comportamental – especificar: teste claro/escuro; teste de comportamento social e teste de tanque novo; administração de substâncias - especificar a via: imersão na água; eutanásia – especificar: resfriamento por imersão do peixe-zebra em água gelada (0 a 4ºC) de acordo com o item 8.14.13 da resolução normativa número 37 de 15 de fevereiro de 2018; outro procedimento– especificar: Coleta de encéfalo após eutanásia e análise de amostras ou dados experimentais.
Colaboradores	**Funções no projeto**
Paula Pinheiro Teixeira	Manipulação; monitoramento do bem-estar animal; teste físico e/ou comportamental – especificar: teste claro/escuro, teste de comportamento social e teste do tanque novo; administração de substâncias - especificar

	a via: imersão na água; eutanásia – especificar: imersão em água gelada; outro procedimento– especificar: coleta do encéfalo após eutanásia e análise de amostras ou dados experimentais.
Roberta da Silva Carneiro	Manipulação; monitoramento do bem-estar animal; teste físico e/ou comportamental – especificar: análise de comportamento; administração de substâncias - especificar a via: imersão na água; eutanásia – especificar: Resfriamento pela imersão do peixe-zebra em água gelada (0 a 4°C) de acordo com item 8.14.13 da Resolução normativa nº 37, de 15 de fevereiro de 2018; outro procedimento– especificar: coleta de encéfalo após eutanásia e análise de amostras ou dados experimentais.

Carlo José Freire de Oliveira
Coordenador da CEUA/UFTM

Documento assinado eletronicamente por **CARLO JOSE FREIRE DE OLIVEIRA**, **Coordenador(a) da Comissão de Ética no Uso de Animais**, em 29/05/2025, às 09:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020 e no art. 34 da Portaria Reitoria/UFTM nº 215, de 16 de julho de 2024.

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.uftm.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1523188** e o código CRC **830905BD**.