



UFRPE

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISILOGIA ANIMAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL**

THAMIRIS PINHEIRO SANTOS

**EFEITOS TÓXICOS DA TIROXINA LIVRE, COMPLEXADA À
CICLODEXTRINA E LEVOTIROXINA NOS PARÂMETROS BIOLÓGICOS DO
Colossoma macropomum EXPOSTO A TESTE DE TOXICIDADE CRÔNICA**

RECIFE

2017

THAMIRIS PINHEIRO SANTOS

**EFEITOS TÓXICOS DA TIROXINA LIVRE, COMPLEXADA À
CICLODEXTRINA E LEVOTIROXINA NOS PARÂMETROS BIOLÓGICOS DO
Colossoma macropomum EXPOSTO A TESTE DE TOXICIDADE CRÔNICA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical pela Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal Tropical.

Orientador:

Professor Doutor Pabyton Gonçalves Cadena

RECIFE

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

S237e Santos, Thamiris Pinheiro
Efeitos tóxicos da tiroxina livre, complexada à ciclodextrina e levotiroxina nos parâmetros biológicos do *Colossoma macropomum* exposto a teste de toxicidade crônica / Thamiris Pinheiro Santos. – 2017.
81 f. : il.

Orientador: Pabyton Gonçalves Cadena.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, Recife, BR-PE, 2017.
Inclui referências.

1. Disruptor endócrino 2. Hormônio tireoidiano 3. Complexo de Inclusão 4. Metabolismo 5. Comportamento animal I. Cadena, Pabyton Gonçalves, orient. II. Título

CDD 636.089

THAMIRIS PINHEIRO SANTOS

EFEITOS TÓXICOS DA TIROXINA LIVRE, COMPLEXADA À
CICLODEXTRINA E LEVOTIROXINA NOS PARÂMETROS BIOLÓGICOS DO
Colossoma macropomum EXPOSTO A TESTE DE TOXICIDADE CRÔNICA

Data de defesa: 23/02/2017

Resultado Aprovada

Thamiris Pinheiro Santos

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Pabyton Gonçalves Cadena (Presidente)

Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal

Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Prof. Dr. Athiê Jorge Guerra Santos (1° Titular)

Departamento de Pesca e Aquicultura – DEPAq - UFRPE

Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Profa. Dra. Maria Adélia Borstelmann de Oliveira (2° Titular)

Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal – DMFA - UFRPE

Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Dedico

À Deus, aos meus pais Jailson e Flávia,
ao meu irmão Thiago e a minha avó M^a
Luiza, pelo suporte em todos os
momentos desta jornada.

AGRADECIMENTOS

Não poderia ser de forma diferente que dirijo meu primeiro e maior agradecimento a Deus, por ter sido o alvo primordial da minha existência e persistência no decorrer de toda essa jornada, dando-me forças para lutar e passar por cima de todos os obstáculos já encontrados no caminho.

Aos meus pais Jailson e Flávia, por terem me incentivado em todos os momentos. Sou grata por terem passado momentos difíceis ao meu lado e por muito terem renunciado dos seus sonhos para que eu pudesse realizar os meus. Eis que estou aqui dando valia a tudo que abdicaram por mim.

Imprescindível agradecimento ao meu irmão Thiago, homem de grande caráter e muita inteligência. O grande espelho da minha vida acadêmica e profissional, que me apoiou e incentivou todas as minhas erguidas de cabeça para que nunca desistisse dos estudos.

À minha avó paterna Maria Luiza, grande guerreira, que no auge dos seus 79 anos de idade vive sã, aplaudindo orgulhosa a minha conquista.

À minha bizavó paterna Maria do Carmo e ao meu avô materno Paulo Roberto, que lá de cima ao lado do Pai, devem estar maravilhados, pois sempre diziam que ver os netos formados era o maior sonho... Infeliz ou felizmente isso não pode ser realizado em vida, mas jamais poderia deixar de dedicar isto também a vocês. Saudades!

Ao meu namorado Gilson, pelo apoio e paciência com minha falta de tempo e o estresse na fase corrida dessa caminhada.

À minha cadelinha Yucca, por todo o amor e carinho concebido. Por ser agente transformador dos meus momentos de desânimo e tristeza.

Aos tios, tias, primos, primas, madrinha, padrinho, que ficaram felizes desde a minha aprovação no vestibular até a pós-graduação.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco, pelos belos sete anos de uma 'maternidade' bem aproveitada e que vêm me dando valiosos frutos.

Ao meu orientador Prof. Dr. Pabyton Gonçalves Cadena, pela confiança orientação e apoio com a ciência.

A todos que compõem o LECA, em especial Marília, Priscila, André, Stephannie, Jadson, Tiago, Niely, Amanda, pela ajuda constante.

Aos meus amigos da graduação de Licenciatura em Educação Física, pelo depósito de confiança e por vezes enxergarem em mim um exemplo a ser seguido.

Aos colaboradores deste trabalho, Professor Fabrício e Elton, que embora sejam de outros laboratórios abdicaram de suas ocupações e descanso para realização de algumas análises.

Aos integrantes da banca examinadora.

À CNPq e FACEPE pelo apoio financeiro dado para que essa pesquisa fosse desenvolvida.

Gratidão a todos!

"Não há transição que não implique um ponto de partida, um processo e um ponto de chegada. Todo amanhã se cria num ontem, através de um hoje. De modo que o nosso futuro baseia-se no passado e se corporifica no presente. Temos de saber o que fomos e o que somos, para sabermos o que seremos".

Paulo Freire

RESUMO

Os efeitos tóxicos da tiroxina (T_4) livre, complexada à β -ciclodextrina (β -CD- T_4) e da levotiroxina (L- T_4) nos parâmetros biológicos de tambaqui (*Colossoma macropomum*) foram avaliados. Os animais foram expostos em testes de toxicidade crônica aos hormônios nas concentrações de água não tratada (ANT - 60 ng/L) por 2 meses e água tratada (AT - 20 ng/L e 40 ng/L) por 12 meses. Foram avaliados, o peso e comprimento, comportamento animal, taxa metabólica, consumo de oxigênio e eletrorretinografia. Os juvenis de tambaqui expostos ao β -CD- T_4 (ANT) apresentaram redução ($p < 0,05$) no peso comparado aos demais grupos (14,1% - controle e T_4 , e 13,21% - L- T_4) e comprimento (5,71%) comparado a T_4 livre. Os animais expostos a T_4 livre (AT) apresentaram aumento (8,48%) no crescimento em peso ($p < 0,05$). Nas observações comportamentais dos animais expostos a L- T_4 (ANT) foi observada redução ($p < 0,05$) nos eventos Nadar Lento e Permanecer Parado. Animais expostos ao β -CD- T_4 (ANT) reduziram a exibição do evento Nadar Lento e Fugir, mas aumentaram a exibição de Permanecer Parado. Os animais expostos ao β -CD- T_4 (20 ng/L - AT) aumentaram a exibição do evento Ataque Lateral. Não foram observadas diferenças na taxa metabólica, porém os animais expostos ao complexo β -CD- T_4 (40 e 60 ng/L) apresentaram maior consumo de O_2 . L- T_4 e β -CD- T_4 promoveram redução na capacidade dos animais em responderem a estímulos nos fotorreceptores e nas células ON-bipolares de acordo com o exame fotópico. No eletroretinograma *flicker* não foram observadas alterações ($p > 0,05$) na latência e amplitude das ondas. Pode-se concluir que a complexação de T_4 à β -CD alterou a toxicidade do hormônio, promovendo alterações no peso, comprimento, comportamento e consumo de O_2 dos animais, sugerindo que produtos disponibilizados com complexos de inclusão, devem ser submetidos a novos testes de toxicidade.

PALAVRAS-CHAVE: Disruptor endócrino, Hormônio tireoidiano, Complexo de inclusão, Metabolismo, Comportamento animal.

ABSTRACT

The toxic effects of free thyroxine (T_4), complexed into β -cyclodextrin (β -CD- T_4) and levothyroxine (L- T_4) on the biological parameters of tambaqui (*Colossoma macropomum*) were evaluated. The animals were exposed in a chronic toxicity test to the compounds at the concentrations of untreated water (ANT – 60 ng/L) for 2 months and treated water (AT – 20 ng/L and 40 ng/L) for 12 months. Weight and length, animal behavior, metabolic rate, oxygen consumption and electroretinography were evaluated. The juvenile tambaqui were exposed to β -CD- T_4 in ANT had a reduction ($p < 0,05$) in the weight compared to the other groups (14.1% - control and T_4 and 13.21% - L- T_4) and length (5.71%) compared to free T_4 . Besides, the animals exposed to free T_4 in AT had an increase (8.48%) in weight gain ($p < 0.05$). Behavioral observations of the animals exposed to L- T_4 in ANT showed a reduction ($p < 0.05$) in the Slow Swimming and Staying Motionless events. The animals exposed to the β -CD- T_4 (ANT) reduced the display of the Slow Swimming and Escape event, but increased the Staying Motionless. The animals exposed to β -CD- T_4 (20 ng/L - AT) increased the Lateral Attack event. No significant differences ($p > 0.05$) were observed in the metabolic rate, but the animals exposed to the β -CD- T_4 complex (40 and 60 ng/L) had the highest O_2 consumption. L- T_4 and β -CD- T_4 promoted a reduction in the ability of the animals to respond to stimuli in the photoreceptors and ON-bipolar cells according to the photopic examination. In flicker electroretinogram, no differences ($p > 0.05$) were observed in the latency and wave amplitude. It can be concluded that the complexation of T_4 to β -CD altered the toxicity of the hormone, promoting changes in the weight, length, behavior and oxygen consumption of the exposed animals, suggesting that new toxicity tests should be performed on the hormones available containing inclusion complexes with cyclodextrins.

KEYWORDS: Endocrine disruptor, Thyroid hormone, Inclusion complex, Metabolism, Animal behavior.

LISTA DE FIGURAS

Revisão de Literatura

Figura 1: *Colossoma macropomum* (Fonte: Própria autora).....25

Capítulo 1

Figura 1: Eventos comportamentais em juvenis de *Colossoma macropomum* expostos em teste de toxicidade crônica simulando a concentração de tiroxina presente em água não tratada (A) durante 2 meses de exposição, e teste de toxicidade crônica simulando a concentração de tiroxina presente em água tratada (B) durante 12 meses de exposição. Os eventos são: NL – Nadar Lento; NR - Nadar Rápido; NJ – Nadar Junto; ES - Emergir e Submergir; PP - Permanecer Parado; PR - Perseguir; FR - Fugir; AF - Ataque Frontal; AL - Ataque Lateral; CO - Comer; FO - Forragear; RA - Respiração Aérea; SA - Saltar; NE - Natação Errática; IM - Imóvel; NS - Natação Superficial; CP - Coprofagia; PVS - Permanecer verticalmente na superfície; CA – Compulsão Alimentar. *Os grupos tiveram seus dados de comportamento comparados pelo Teste de Tukey com $p < 0,05$ com letras iguais não diferindo estatisticamente.....50

Figura 2: Taxa metabólica e consumo de oxigênio em juvenis de *Colossoma macropomum* expostos em teste de toxicidade crônica a tiroxina, tiroxina complexada a ciclodextrina e levotiroxina simulando a concentração do hormônio presente em ANT (A e B) durante 2 meses de exposição e em AT (C e D) em função de cada tratamento aplicado nos três últimos meses do experimento (10-12 meses). A e C representam a taxa metabólica para cada grupo experimental; B e D representam o consumo de oxigênio para cada grupo experimental ao longo de 30 minutos. *Diferença significativa ($p < 0,05$) observada no consumo de oxigênio em 30 min dos animais expostos ao complexo β -CD- T_4 a 60 ng/L (B) e β -CD- T_4 a 40 ng/L (D) em relação aos animais expostos a T_4 livre e Controle.....52

Figura 3: Eletrorretinograma fotópico de *Colossoma macropomum in vivo* em ensaio de toxicidade crônica simulando concentrações de T₄ em água não tratada (ANT). Latência e amplitude das ondas *a* e *b* são mostradas.....52

Capítulo 2

Figura 1: A figura 1 representa o dispositivo com vista frontal, composto por um tubo alongado transparente (1) para visualização do animal no momento do teste, com entrada (2) e saída de água (3), uma abertura na parte superior (4) com tampa (5) para entrada do animal no sistema, tela de proteção (6) no início e final do tubo para evitar ferimentos no animal em casos de arrastamento pela correnteza, bomba (7), registro (8) para controlar a vazão da água, sensor medidor de fluxo de água (9), ligado por uma fiação elétrica (11), a um sistema arduíno de monitoramento de velocidade em tempo real (10), disposto na extremidade de saída de água (3), conectado por tubulações (13), a um reservatório de água (14) com tampa (15) onde podem ser controlados e monitorados os parâmetros físico-químicos da água, base de sustentação (16), haste de sustentação (17), alça de sustentação (18) para levar o dispositivo na mão.....71

Figura 2: A figura 2 representa a lateral do equipamento com o tubo alongado transparente (1) suspenso pelas hastes de sustentação (17) e acomodado na base de sustentação (16).....72

Figura 3: A figura 3 representa o sensor medidor de fluxo (9) de água ligado por uma fiação elétrica (11), a um sistema arduíno com monitoramento de velocidade em tempo real (10) e display (12).....73

LISTA DE TABELAS

Revisão de Literatura

Tabela 1: Propriedades Físico-Químicas da Levotiroxina (L-T₄).....21

Capítulo 1

Tabela 1: Efeito da tiroxina livre (T₄ Livre), levotiroxina (L- T₄) e tiroxina complexada a ciclodextrina (β -CD-T₄) no crescimento em peso e comprimento do tambaqui (*Colossoma macropomum*) durante 2 meses de exposição ao teste de toxicidade crônica simulando a concentração de tiroxina presente em água não tratada (ANT), e trimestralmente durante 12 meses de exposição ao teste de toxicidade crônica simulando a concentração de tiroxina presente em água tratada (AT).....49

Tabela 2: Efeitos da tiroxina livre (T₄ Livre), levotiroxina (L- T₄) e tiroxina complexada a ciclodextrina (β -CD-T₄) a 60 ng/L no exame fotópico e *flicker*, latência e amplitude das ondas, em *Colossoma macropomum* em teste de toxicidade crônica simulando concentração de água não tratada (ANT) após 2 meses de exposição.....54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>DEs</i>	Disruptores endócrinos
<i>T₃</i>	Triiodotironina
<i>T₄</i>	Tiroxina
<i>L-T₄</i>	Levotiroxina
<i>CD</i>	Ciclodextrina
<i>β-CD</i>	Betaciclodextrina
<i>OD</i>	Oxigênio dissolvido
<i>ERG</i>	Eletroretinograma
<i>NL</i>	Nadar Lento
<i>NR</i>	Nadar Rápido
<i>NJ</i>	Nadar em Grupo
<i>ES</i>	Emergir e Submergir
<i>FI</i>	Ficar imóvel
<i>PR</i>	Perseguir
<i>FR</i>	Fugir
<i>AF</i>	Ataque Frontal
<i>AL</i>	Ataque Lateral
<i>CO</i>	Comer
<i>FO</i>	FORAGEAR
<i>RA</i>	Respiração Aérea
<i>SA</i>	Saltar
<i>NE</i>	Natação Errática
<i>DO</i>	Deitado
<i>NS</i>	Natação Superficial
<i>CP</i>	Coprofagia
<i>PVA</i>	Pendurado Verticalmente na Água
<i>DA</i>	Desordem Alimentar
<i>ERG</i>	Eletroretinograma
<i>ANT</i>	Teste de toxicidade crônica simulando concentração de água não tratada
<i>AT</i>	Teste de toxicidade crônica simulando concentração de água tratada
<i>DO</i>	Oxigênio Dissolvido

SUMÁRIO

1. Introdução	15
2. Revisão Bibliográfica	17
2.1. Disruptores endócrinos.....	17
2.2. Hormônios como disruptores endócrinos	18
2.2.1. Hormônios tireoidianos (T ₃ e T ₄).....	19
2.2.2. Levotiroxina (L-T ₄)	21
2.3. Limitação no uso de hormônios como medicamentos.....	22
2.3.1. Ciclodextrinas na tecnologia farmacêutica.....	22
2.4. Peixes em estudo de toxicidade.....	23
2.4.1. O tabaqui como modelo animal para estudos toxicológicos	24
2.4.2. Coleta de dados fisiológicos, comportamentais em peixes.....	26
3. Objetivos	30
3.1. Objetivo Geral	30
3.2. Objetivos Específicos	30
4. Referências Bibliográficas.....	31
Capítulo I – Artigo: Efeitos tóxicos da tiroxina livre, complexada à ciclodextrina e levotiroxina nos parâmetros biológicos do <i>Colossoma macropomum</i> exposto em teste de toxicidade crônica	41
1. Introdução.....	42
2. Material e Métodos	45
3. Resultados.....	48
4. Discussão	54
5. Conclusão.....	56
6. Agradecimentos.....	56
7. Referências	57
Capítulo II – Patente: Dispositivo portátil tipo túnel de natação para determinação da capacidade natatória em animais aquáticos	60
1. Relatório descritivo	60
2. Reivindicações	69
3. Resumo	70
4. Desenho	71
5. Conclusão	74
6. Anexos.	76

1. Introdução

O hormônio tiroxina (T_4) e sua forma ativa, a triiodotironina (T_3), são sintetizados e liberados pela glândula tireoide tendo efeito no crescimento, desenvolvimento e função dos principais tecidos do corpo (Ajay, 2013), ainda ajudam a regular o metabolismo, o consumo de energia e a termogênese (Darbre, 2015). Quando há disfunção da glândula tireoide na produção e secreção destes hormônios tireoidianos pode ser necessário a reposição a partir de formas sintéticas da T_4 como a Levotiroxina (L- T_4) (Lakkakula et al., 2012). Devido ao hipotireoidismo, a L- T_4 pode ser utilizada durante toda a vida do indivíduo (Madeira, 2011) sendo o quarto medicamento mais vendido no Brasil (Correio popular, 2015). Adicionalmente, T_4 devido a sua característica hidrofóbica foi complexado à ciclodextrina (CD) para reduzir essa limitação (Lakkakula et al., 2012).

As CDs podem formar complexos de inclusão com várias substâncias aumentando assim a biodisponibilidade, absorção, solubilidade em água e estabilidade química destas (Loftsson, 2015; Cadena et al., 2011). CDs são oligossacarídeos cíclicos, formados por monômeros de glicose, unidos por ligações glicosídicas α -(1,4), com cavidade hidrofóbica e exterior hidrofílico que quando em solução aquosa incorpora a sua cavidade as moléculas hidrofóbicas formando complexos de inclusão (Loftsson, 2015; Loftsson e Brewster, 2010). Não apresentam efeito tóxico quando administradas por via oral em medicamentos, devido à pouca absorção pelo trato gastrointestinal e eliminação na sua forma inalterada na excreção (Loftsson e Brewster, 2012), e ainda protegem as moléculas bioativas de efeitos ambientais secundários como temperatura, pH e luz (Pinho et al., 2014). Mas, devido às alterações das propriedades físico-químicas descritas acima das moléculas complexadas não são conhecidos os efeitos tóxicos destes novos compostos. Segundo Loftsson e Brewster (2010), em 2010 havia mais de 35 medicamentos disponíveis no mercado a base de CDs. Em contrapartida, já existe um medicamento de tiroxina a base de CD patenteado (US005856359) pela empresa alemã Hexel.

Devido à utilização de hormônios tireoidianos livres e complexados a CDs, bem como a sua forma sintética (L- T_4), pode ocorrer o descarte destas substâncias no ambiente, neste caso, são considerados disruptores endócrinos (DEs), que são substâncias químicas naturais ou sintéticas capazes de imitar ou interferir na ligação

e na ação dos hormônios naturais do corpo, interferindo assim nos processos fisiológicos (Abdallah, 2016). Os fármacos entram no sistema aquático por diferentes maneiras. A origem da contaminação é antropogênica devido ao descarte no lixo doméstico e hospitalar ou esgoto comum. Segundo Fent et al. (2006), a principal contaminação se dá através da ingestão de medicamentos pelos seres humanos, posteriormente os seus metabólitos são eliminados pela excreção, desembocando diretamente no ambiente aquático ou chegando nas águas residuais por limitações na remoção de fármacos encontradas nos sistemas de tratamento de água (Svanfelt et al., 2010). Se tratando especificamente de T_4 , embora Svanfelt et al. (2010) tenham determinado os valores aproximados de 60 e 20 ng/L de T_4 em água não tratada e água tratada, respectivamente, a literatura é escassa quanto aos trabalhos que avaliam seu efeito toxicológico na biota aquática.

Diante da problemática acima apresentada, faz-se necessário o desenvolvimento de estudos que analisem o efeito da T_4 livre, complexada a β -CD e da levotiroxina em peixes como modelo animal, avaliando como tais substâncias afetam os sistemas biológicos e se esses animais são sensíveis a presença de produtos químicos no ambiente aquático. A espécie *Colossoma macropomum* (tambaqui) pode apresentar-se como um bom modelo para ensaios ecotoxicológicos por ser utilizada em estudos como bioindicadores de qualidade ambiental (Soares et al., 2016). O tambaqui é um peixe da bacia amazônica, distribuído pela América do Sul, tem carne bastante apreciada (Dairiki e Silva, 2011). No ano de 2013 foi uma das espécies mais cultivadas do Brasil tendo produção total de 88.719 toneladas (IBGE, 2013).

Estudos sobre a toxicidade de T_4 , L- T_4 e β -CD em *C. macropomum* não foram encontrados na literatura. Por ser um peixe com ampla distribuição e comercialização no Brasil, utilizado para alimentação, tendo seu potencial aumentado quanto aos riscos que pode causar à saúde pela bioacumulação, é importante analisar os possíveis efeitos tóxicos causados por DEs nesses animais. Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos tóxicos do hormônio tiroxina livre e complexada a β -ciclodextrina e da levotiroxina sobre os parâmetros biológicos tais como peso, comprimento, comportamento e taxa metabólica de *Colossoma macropomum* (tambaqui) e ainda avaliar se a complexação com a ciclodextrina torna a T_4 mais tóxica em relação aos parâmetros

biológicos analisados. Ainda, foi desenvolvido um dispositivo para a determinação da capacidade natatória em peixes podendo ser utilizado sob diferentes parâmetros físico-químicos, presença de fármacos ou outros produtos químicos com aplicação no desenvolvimento de medicamentos ou testes toxicológicos.

2. Revisão de Literatura

2.1. Disruptores endócrinos

Disruptores endócrinos (DEs) são substâncias químicas, naturais ou sintéticas, capazes de imitar ou interferir a ligação e ação dos hormônios naturais do corpo, interferindo assim nos processos fisiológicos (ABDALLAH, 2016), afetando adversamente o sistema endócrino, trazendo danos irreversíveis e de vários níveis na vida animal e saúde humana (BILA; DEZOTTI, 2007; FUHRMAN et al., 2015). Mesmo apresentando-se em baixas concentrações, os DEs podem interferir no funcionamento normal do sistema endócrino de espécies animais, o que inclui os seres humanos (GHISELLI; JARDIM, 2007).

Muitas das substâncias que se enquadram como DEs tem a propriedade de persistir no ambiente ao acumularem-se no solo, nos sedimentos dos rios e também nos organismos (GUIMARÃES, 2005), o que compromete a cadeia alimentar pelo processo de bioacumulação (SILVA; CONFORTI, 2013), podendo gerar riscos à saúde de quem se encontra no topo, como os seres humanos. Mesmo sendo encontrados no meio ambiente com concentrações na ordem de $\mu\text{g/L}$ e ng/L , os DEs são capazes de provocar diversos efeitos tóxicos ao contaminarem os organismos por via oral, nasal ou cutânea (BILA; DEZOTTI, 2007; FONTENELE et al., 2010; FERREIRA, 2012; KHETAN, 2014), trazendo danos à saúde e afetando também o crescimento e a reprodução (COLBORN et al., 1993; SILVA; CONFORTI, 2013). Bila e Dezotti (2007) destacaram alguns possíveis danos que os DEs podem causar à saúde, como o comprometimento direto de um órgão endócrino levando a alteração da função e do metabolismo deste, e a interação com receptores hormonais. Estes efeitos provocam doenças em todo o ciclo de vida como o câncer, doenças metabólicas, mau funcionamento de vários tecidos, de órgãos e da reprodução (HAMPL et al., 2014), o que diretamente podem interferir no desenvolvimento saudável da prole, sendo esta a principal preocupação toxicológica (FERREIRA, 2012).

Os DEs podem ter origem natural, como os hormônios reprodutivos a exemplo dos estrógenos e andrógenos, hormônios da tireoide, e os corticosteroides, bem como uma grande diversidade de produtos químicos, tais como os hormônios sintéticos, bifenilas policloradas (PCB), dioxinas, furanos, alquilfenóis, ftalatos, bisfenol A e pesticidas (POLLONI-SILVA et al., 2017; FERREIRA, 2012). Além destes, muitos produtos farmacêuticos podem ser considerados DEs, como o dietilestilbestrol usualmente consumível para o tratamento de câncer de próstata, bem como o 17β -estradiol, a estrona e o estriol (hormônios naturais) que estão presentes em alguns medicamentos contraceptivos (KHETAN, 2014).

Essas substâncias, tanto de origem natural como sintética, acabam sendo liberadas no meio aquático pela indústria, lixo domiciliar, medicamentos, produtos para esterilização hospitalar, acarretando na contaminação do solo, lençóis freáticos, e estações de tratamento de água. Também são liberadas pelos processos fisiológicos naturais do corpo como urina e fezes humana e animal, (GUIMARÃES, 2005; GHISELLI; JARDIM, 2007; SCHIAVINI et al., 2011). Muitos desses compostos são amplamente estudados em relação aos seus efeitos tóxicos, porém a tiroxina, um hormônio natural do corpo e sua forma sintética, a levotiroxina utilizada no tratamento do hipotireoidismo, também podem ser consideradas DEs quando encontradas no ambiente, porém poucos estudos revelam efeitos da sua toxicidade.

2.2. Hormônios como disruptores endócrinos

O sistema endócrino constitui um dos principais sistemas reguladores da fisiologia do corpo, desde o nascimento até a fase adulta, incluindo o crescimento e a função do sistema reprodutor, como também níveis de metabólitos no sangue (KHETAN, 2014). Ele é constituído por uma rede extensa de glândulas produtoras de hormônios, como a glândula pituitária, as glândulas suprarrenais e a glândula tireoide. Esta última é uma das maiores glândulas endócrinas em seres humanos adultos (AIRES, 2012), sendo responsável por secretar os hormônios triiodotironina (T_3) e tetra-iodotironina ou tiroxina (T_4), mas também secreta calcitonina (RAVEN; JOHNSON, 2002). A secreção dos hormônios T_4 e T_3 é controlada principalmente pelo hormônio estimulante da tireoide (TSH), que é secretado pela hipófise anterior (GUYTON; HALL, 2017). Em humanos saudáveis, a T_4 é excretada numa média de 1820 pmol/ 24 horas (FABER et al., 1981), enquanto que nas fezes é encontrada na concentração de $1,03 \pm 0,65$ nmol/g (TALWAR; SRIVASTAVA, 2006).

Na presença de algum DE, a ação dos hormônios naturais que são secretados pelas glândulas do corpo será mascarada, e os receptores poderão ligar-se a outras substâncias químicas modificando a resposta natural. Ghiselli e Jardim (2007) descreveram então dois processos que podem ocorrer na presença de DEs: i. O DE pode apresentar um papel mimetizador, imitando a ação de um hormônio (efeito agonista), ou ainda ii. Ter um papel bloqueador, sem provocar resposta, impedindo assim que o hormônio natural se ligue ao seu receptor específico (efeito antagonista).

2.2.1. Hormônios tireoidianos (T_3 e T_4)

A glândula tireoide é formada por numerosos folículos fechados, preenchidos por coloide e revestidos por células epiteliais cuboides que secretam substâncias dentro dos folículos. O coloide é composto pela tireoglobulina, que apresenta cerca de 70 aminoácidos de tirosina, o principal substrato a se combinar com o iodo e formar os hormônios tireoidianos (HTs) (GUYTON; HALL, 2017). Nos peixes a síntese dos hormônios tireoidianos ocorre da mesma forma (OTERO et al., 2014).

A síntese e secreção desses hormônios é regulada pelo sistema de *feedback* negativo que envolve o hipotálamo, hipófise anterior e a glândula tireoide. O hipotálamo produz o hormônio liberador da tireotrofina (TRH) que age na hipófise anterior para que esta produza o hormônio estimulante da tireoide (TSH), que por sua vez estimula a tireoide a produzir T_4 e T_3 (GUYTON; HALL, 2017).

A conversão de T_4 para T_3 ocorre nos tecidos periféricos através da remoção enzimática de uma unidade de iodo do anel externo do T_4 , processo denominado desiodação, e dele depende a atividade de praticamente todos os tecidos do organismo. Assim, é necessário ter níveis intracelulares de T_3 adequados para garantir a manutenção da atividade normal dos tecidos-alvo (POWER et al., 2001; NUNES, 2003).

Aproximadamente 93% dos HTs secretados consistem de T_4 , enquanto que os 7% restantes são de T_3 (GUYTON; HALL, 2017). T_4 e T_3 contêm quatro e três átomos de iodo respectivamente ligados à molécula de tirosina (DARBRE, 2015). As funções desses hormônios são iguais, porém a velocidade e intensidade de ação são diferentes. Segundo Schmidt-Nielsen (2010) em humanos a T_3 é quatro vezes mais potente que a T_4 , porém sua presença no sangue é menor, persistindo então por um período mais curto que a T_4 .

Seus efeitos fisiológicos estão relacionados ao aumento do número e da atividade mitocondrial, crescimento, estimulando também o metabolismo lipídico e de carboidratos, podem reduzir o peso corporal, aumentar o fluxo sanguíneo, excitar o sistema nervoso central (GUYTON; HALL, 2017). Ainda, desempenham papéis críticos no desenvolvimento embrionário, envolvidos no desenvolvimento dos órgãos sensoriais como olhos e ouvidos (DARBRE, 2015).

Em vertebrados superiores, esses hormônios tem a função de estimular o metabolismo oxidativo, e quando elevada a concentração destes, a taxa metabólica é aumentada (SCHMIDT-NIELSEN, 2010). HTs também têm papel importante em outros processos biológicos em uma variedade de espécies de peixes, como o desenvolvimento sexual, osmoregulação, metamorfose, tolerância à temperatura e migração (GARG, 2007).

Quando há disfunção da glândula tireoide, o fornecimento de HTs para o corpo pode ser insuficiente ou excessivo, acarretando nas doenças conhecidas como hipotireoidismo e hipertireoidismo, respectivamente. O hipotireoidismo define-se como um estado clínico resultante da quantidade reduzida ou ausência de hormônios da tireoide circulantes para suprir a função normal do corpo, já o hipertireoidismo é caracterizado pelo aumento dos hormônios tireoidianos circulantes devido ao aumento da função da glândula tireoide (OLIVEIRA; MALDONADO, 2014). A doença da tireoide está presente de 3 a 5% da população humana (ARTHUR; BECKETT, 1999).

2.2.2. Levotiroxina (L-T₄)

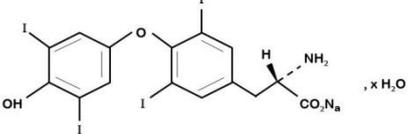
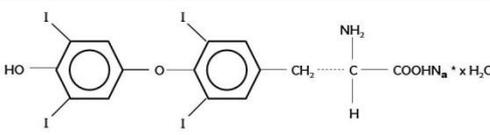
As propriedades físico-químicas da L-T₄ estão descritas na Tabela 1. Trata-se de um hormônio sintético utilizado no tratamento de hipotireoidismo. Sua administração, em dosagens corretas e prescritas pelo médico, substitui o hormônio que seria normalmente produzido pela glândula tireoide (LAKKAKULA et al., 2012) sendo necessário então o tratamento por toda a vida do indivíduo, exceto em caso de hipotireoidismo transitório (MADEIRA, 2011). Segundo Ward (2011) as doses do medicamento variam de acordo com o sexo, peso, uso de medicamentos concomitantes e alguns outros fatores, o que exige monitoração contínua e adição de precauções a depender do caso do paciente.

A absorção de L-T₄ quando administrada oralmente varia de 40% a 80% a partir do trato gastrointestinal, sendo a maior parte da dose absorvida pelo jejuno e íleo superior (FDA, 2016). Após a ingestão, a absorção de L-T₄ é incompleta caso o

comprimido seja tomado juntamente com o alimento, sendo aumentada se tomado no período de jejum. Sua eliminação pelo organismo do ser humano ocorre lentamente, na proporção de 20-40% pelas fezes e 30-55% pela urina, tendo meia-vida de aproximadamente 7 dias em uma pessoa considerada normal (ELTROXIN TABLETS NZ DATA SHEET, 2014), com a excreção urinária diminuindo com a idade (FDA, 2016).

O Brasil em 2015 movimentou o mercado farmacêutico com vendas de medicamentos somando R\$ 43,1 bilhões, segundo dados da Interfarma (2015). A Levotiroxina sódica foi o quarto medicamento mais vendido no país (CORREIO POPULAR, 2015).

Tabela 1: Propriedades Físico-Químicas da Levotiroxina.

Nome comum	Levotiroxina
Nome comercial do produto	Puran T ₄ , Synthroid, Euthyrox, Levoid
Estrutura química	 <p>(MHRA, 2013)</p>
Fórmula estrutural	 <p>(FDA, 2016)</p>
Fórmula molecular	C ₁₅ H ₁₀ I ₄ N NaO ₄ * H ₂ O (FDA, 2016)
Peso molecular	798,86 g/mol (anidro) (FDA, 2016)
Solubilidade em água	inferior a 1,5 mg / ml (MHRA, 2013)
Taxa de dissolução	~ 0,0002 mg/min/cm ² - lento (MHRA, 2013)
Estabilidade	Fisicamente estável na sua forma pentaidratada abaixo de 50 ° C (MHRA, 2013)
Decomposição	A altas temperaturas, quando exposta ao ar, sofre desidratação rápida, seguida por degradação (MHRA, 2013)

2.3. Limitação no uso de hormônios em medicamentos

Hormônios são comumente utilizados em medicamentos, o que inclui os hormônios tireoidianos, que possuem baixa solubilidade em água e baixa disponibilidade. A meia-vida da T₄ é aproximadamente 7 a 10 dias no plasma

sanguíneo, enquanto que a da T_3 é de 36 horas (MESSIAS et al., 1999). A ciclodextrina apresenta-se então como uma alternativa para contornar esta dificuldade, na tentativa de aumentar a biodisponibilidade e a estabilidade do fármaco no organismo, ao mesmo tempo em que possibilita reduzir a dose terapêutica administrada.

2.3.1. Ciclodextrinas na tecnologia farmacêutica

Ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos compostos por números variáveis de monômeros de glicose, ligadas por ligações glicosídicas α -1,4, produzidas a partir da hidrólise enzimática do amido por alguns microorganismos, sendo, portanto, um produto natural (LOFTSSON, 2015). Também chamadas de cicloamiloses, ciclogucanos ou dextrinas de Schardinger (FRACETO et al., 2007). As mais comuns apresentam de seis a oito ($\alpha = 6$, $\beta = 7$, $\gamma = 8$) unidades de D-glicose (VELMURUGAN et al., 2017), sendo a β -CD mais utilizada devido ao seu baixo custo e por ter uma cavidade com tamanho adequado para complexação de várias moléculas de interesse industrial (CHENG et al., 2017). Dentre as CDs naturais, a β -ciclodextrina apresenta menor solubilidade em água, podendo estar relacionadas à forte ligação que apresentam em estado cristalino (LOFTSSON; BREWSTER, 2010).

A estrutura das CDs apresenta uma cavidade hidrofóbica formada pelo núcleo de hidrocarboneto o que permite a formação de complexos de inclusão com componentes lipofílicos (MICHALSKA et al., 2017). Ainda, possui exterior hidrofílico formado por numerosas hidroxilas que podem se ligar à água.

As CDs possuem baixa toxicidade quando administradas por via oral (LOFTSSON; BREWSTER, 2012) ou por via parentérica, pois são excretadas pela urina de forma inalterada devido ao seu baixo peso molecular (LOFTSSON, 2015), e sua meia-vida biológica em seres humanos é de aproximadamente 1,9 h (KURKOV; LOFTSSON, 2013). São capazes de formar complexos de inclusão com fármacos, ao incorporar estas moléculas em sua cavidade central, sendo o aumento da solubilidade, estabilidade e biodisponibilidade das moléculas as principais finalidades da inclusão à ciclodextrinas (PINHO et al., 2014). São encontradas em mais de 35 produtos farmacêuticos que são comercializados (LOFTSSON; BREWSTER, 2010), mas estão presentes também em cosméticos, produtos cromatográficos, têxteis e alimentares (CHENG et al., 2017), porém podem não ser tóxicas aos seres humanos por ter alta biocompatibilidade, além de serem aprovadas pela FDA (*Food and Drug Administration*) (PINHO et al., 2014).

O aumento da biodisponibilidade no corpo de hormônios presentes em produtos farmacêutico complexados a CDs pode reduzir a frequência de administração e/ou a dose necessária para alcançar um efeito biológico (LAKKAKULA et al., 2012). Além disso, as CDs protegem as moléculas bioativas de efeitos ambientais secundários como temperatura, pH e luz (PINHO et al., 2014). Diante disto, estudar a toxicidade de complexos de inclusão com fármacos como poluentes ambientais se torna importante uma vez que também a toxicidade pode ser alterada.

2.4. Peixes em estudos de toxicidade

Devido às atividades industriais, agrícolas e antropogênicas, o ecossistema aquático vem sendo degradado por despejo de diversos produtos químicos (ABDEL-MONEIM et al., 2012). Nas últimas décadas, análises químicas realizadas na água permitiram detectar concentrações muito baixas desses produtos químicos mesmo que na ordem de ng/L (VESTEL et al., 2016). Embora a concentração desses produtos químicos na biota aquática seja pequena, reflete grande preocupação por poderem representar uma ameaça tóxica aos organismos expostos pela sua capacidade de afetar as vias biológicas (SVANFELT et al., 2010; VESTEL et al., 2016). Dentre esses produtos químicos, os farmacêuticos a base de hormônios merecem grande destaque por estarem presentes em produtos de uso humano e veterinário, tendo sua utilização em massa. Os princípios ativos desses fármacos são liberados pelas fezes e urina dos usuários ou animais, sendo esta a principal fonte de contaminação ambiental (FENT, et al., 2006).

Os efeitos tóxicos causados por hormônios presentes no ambiente afetam desde microinvertebrados até grandes vertebrados numa proporção global, e é preocupante por esses compostos serem capazes de interferir na reprodução das espécies, e em consequência, no desenvolvimento da prole (REIS FILHO et al., 2006). Segundo Costa et al. (2008) os testes toxicológicos são procedimentos importantes na avaliação da qualidade das águas e de poluição dos efluentes, por registrarem o efeito das substâncias em organismos vivos.

O constante contato com a água permite que os peixes sejam considerados importantes veículos transportadores de contaminantes para a população humana (ABDEL-MONEIM et al., 2012). Soares et al. (2016) afirmam que os peixes podem ser utilizados como bioindicadores ambientais por estarem no topo da cadeia trófica aquática quando comparados com outros bioindicadores, e também por serem

sensíveis à presença de diversos produtos químicos. Eles apresentam respostas similares aos mamíferos, porém sua utilização em laboratório como bioindicador é mais vantajosa pela facilidade de serem mantidos em laboratório e expostos as substâncias químicas (GROFF, 2008). No Brasil, as espécies de peixes mais utilizadas para ensaios toxicológicos são *Pimephales promelas* (peixe-toupeira) e *Danio rerio* (paulistinha, *zebrafish*), tanto para os ensaios agudos quanto para os crônicos (AREZON, 2011).

Os ensaios de toxicidade aguda são aqueles dispostos a avaliar a capacidade que um contaminante tem de levar os organismos-teste a morte em um curto período de exposição, geralmente de 24 a 96 horas. Nesse teste os valores de concentrações efetivas (CE_{50}) concentrações letais (CL_{50}) podem ser determinados. O primeiro referindo-se à concentração da substância que pode causar um efeito agudo a pelo menos 50% dos organismos expostos, e o segundo à concentração que pode provocar mortalidade de 50% dos organismos-teste. O de toxicidade crônica expõe os animais a um período de tempo mais prolongado e significativo com concentrações sub-letais (que não levam os organismos a morte, mas que podem provocar efeitos tóxicos), variando de uma parte ou todo o ciclo de vida do organismo afim de avaliar efeitos mais sutis (ARENZON, 2011; COSTA et al., 2008) sobre o comportamento, o crescimento e a reprodução.

2.4.1. O tambaqui como um modelo animal para estudos toxicológicos

Dentre os peixes que podem ser utilizados em estudos de toxicidade, o *Colossoma macropomum* (Fig. 5) é uma espécie originária da América do Sul, pertencente a classe Actinopterygii, ordem Characiformes e família Characidae (RODRIGUES, 2014).

É o segundo maior peixe encontrado na Bacia Amazônica, adaptado a ambientes lênticos, como lagos de várzea (ARBELÁEZ-ROJAS et al., 2002). São conhecidos também por diversos nomes como tambaqui, gamitama, cachama e cachama negra (SOUZA, 2009), e apresentam alta longevidade (até 15 anos) (MARCON; FILHO, 1999), bom crescimento e ganho de peso (SOUZA et al., 2009) podendo chegar a apresentar 1 m de comprimento e 30 kg de peso corporal (MATOS et al., 2017). Exibem hábito gregário (BARBOSA et al., 2009), sendo uma das trinta espécies amazônicas, aproximadamente, que migram nos rios em cardumes na fase adulta (comprimento >55 cm) para a dispersão e a reprodução da

espécie (GOULDING; CARVALHO, 1982) ou ainda para forrageamento (MARCON; FILHO, 1999).

Apresenta o corpo com formato romboidal e coberto por escamas, apresentando manchas escuras irregulares no ventre e na cauda em sua fase adulta. Seu dorso tem tonalidade esverdeada, podendo mudar esta coloração a depender das características da água do ambiente, como cor e transparência (BORGES, 2013). Soares et al. (2016) informam que essa mudança de cor é característica de um processo adaptativo imprescindível para a sobrevivência, relacionados à predação e a captura do alimento.

C. macropomum é considerado uma espécie onívora, com seu hábito alimentar, quando juvenil (comprimento <55cm), variando de sementes e frutos durante a estação chuvosa, para zooplâncton e arroz durante a estação seca (ARIDE et al., 2006). Pela presença de dentes molariformes e mandíbulas fortes o tambaqui tem capacidade para esmagar sementes duras (GOULDING; CARVALHO, 1982). Ainda, insetos, macrófitas, algas, moluscos e peixes são também consumidos pela espécie (RODRIGUES, 2014).



Figura 1. Juvenil de *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) em cativeiro, junho de 2015 (Fonte: Própria autora).

Está presente em águas ricas em nutrientes, onde a temperatura média varia entre 25 e 34 °C (PEREIRA JUNIOR, 2013), e devido a essas condições climáticas sua produção é realizada nas regiões Norte, Centro-Oeste e Nordeste (RODRIGUES, 2014). É uma espécie que pode resistir a baixas concentrações de oxigênio dissolvido (~ 1 mg/L) (PEREIRA JUNIOR, 2013), mas quando entram em

estado de hipóxia podem apresentar diferentes respostas, sejam elas comportamentais como subir para a superfície da água para captar oxigênio das águas superficiais, ou ajustes fisiológicos como a expansão temporária do lábio inferior (RODRIGUES, 2014). Mas também suportam mudanças físicas e químicas da água como temperatura, variações de pH, níveis altos de amônia e nitrito (JERÔNIMO et al., 2017).

Dentre as espécies nativas produzidas pela piscicultura brasileira, o tambaqui é um dos peixes mais produzidos e comercializados no Brasil, com uma produção nacional de 22,6% no ano de 2013, o que representa um total de 88.719 toneladas de peixe, movimentando o mercado com R\$ 479.349,00 (quatrocentos e setenta e nove mil e trezentos e quarenta e nove reais), perdendo apenas para a tilápia, que liderou o *ranking* de 2013 com 43,1% da produção. Desse total, a região Norte é destaque na produção, seguida da região Nordeste e Sudeste (IBGE, 2014).

Segundo (ARBELÁEZ-ROJAS et al., 2002) o tambaqui é incessantemente procurado, o que indica sua alta potencialidade no aumento de renda dos produtores através do cultivo, sendo Manaus a principal cidade produtora, destinando-os tanto para consumo interno como para a exportação em países como Cuba, República Dominicana, Estados Unidos, Honduras, Jamaica, Filipinas, Guatemala, Hungria, Costa Rica, Porto Rico e China (MENDONÇA et al., 2012). O mercado internacional apresenta grande aceitação dessa espécie, por apreciarem o sabor da sua carne (JERÔNIMO et al., 2017).

A utilização de *C. macropomum* como organismo teste tem sido relatada em diversos estudos relacionados a fotoperíodo (ARIDE et al., 2006; MENDONÇA et al., 2012), temperatura (SALAZAR-LUGO et al., 2009), tolerância a pH (ARIDE et al., 2007), salinidade (FIÚZA et al., 2015), suplementação (SOUZA, 2009; MENDONÇA et al., 2012; RODRIGUES, 2014), anestésicos (BARBAS et al., 2017), processos antioxidantes (MARCON; FILHO, 1999), biomarcadores (SADAUSKAS-HENRIQUE et al., 2017), criopreservação (VARELA JUNIOR, 2011; GALLEGO et al., 2017), e também produtos químicos como a formalina (ARAÚJO et al., 2004), e pesticidas como lufenuron (SOARES et al., 2016).

2.4.2. Coleta de dados fisiológicos e comportamentais em peixes

A exposição de organismos aquáticos a diferentes concentrações de substâncias consideradas DEs durante um determinado período de tempo define a função do teste de toxicidade, que pode revelar resultados sobre aspectos

ecológicos e efeitos adversos que os poluentes causam a uma comunidade biológica (RUBINGER, 2009).

Um desses efeitos pode ser identificado no comportamento animal, por ser analisado como resposta a um estressor, seja ele de origem endógena ou exógena (KOCHHANN et al., 2013). O comportamento animal é definido por Del-Claro (2004) como tudo que um indivíduo tem a capacidade de fazer, até mesmo quando para de realizar alguma atividade de movimentação por exemplo. Ou seja, mesmo que o animal se apresente parado estará representando um comportamento. A pesquisa do comportamento animal pode contribuir para a melhoria do manejo de espécies e o estudo do bem-estar animal. Esse ramo da ciência ainda se faz importante por dar assistência à compreensão dos aspectos fisiológicos, ecológicos, genéticos e evolutivos de espécies animais (FARIAS et al., 2012).

A taxa metabólica, um indicador fisiológico, é definida por Schmidt-Nielsen (2010) pelo metabolismo energético do animal por unidade de tempo, sendo caracterizado por três variáveis: i. A diferença entre o valor energético de todo alimento e toda a excreção, ii. Pela produção total de calor realizada pelo organismo, iii. Pela quantidade de oxigênio utilizado nos processos de oxidação. Este último é mais utilizado para determinar taxa metabólica, uma vez que o aumento da taxa de captura de oxigênio através das brânquias é uma resposta ao estresse, podendo ser ambiental ou químico por exemplo, e o resultado desse processo é refletido no aumento da taxa ventilatória, do fluxo de sangue branquial, e do transporte de O₂ pelo sangue (TAVARES-DIAS, 2009).

Ainda, a determinação da capacidade natatória também, um indicador fisiológico, é importante para a realização de testes toxicológicos, pois os movimentos de natação dos peixes desempenham uma atividade vital para sua sobrevivência, seja na fuga de predadores, busca de presas, migração, momento reprodutivo, e também no deslocamento em caso de desequilíbrio ambiental (REIDY et al., 2000). A investigação relacionada ao comportamento de natação dos peixes é relatada em estudos de energética molecular, mecânica de natação, trocas gasosas, fisiologia cardíaca, doenças, poluição, hipóxia e temperatura (TIERNEY, 2011). Diante disto, torna-se importante desenvolver dispositivos que tenham a capacidade de determinar este parâmetro de forma rápida e com precisão. A capacidade natatória é a principal característica para determinação da sobrevivência em muitas espécies de animais aquáticos, inclusive em peixes (PLAUT, 2001). Nestes, essa

capacidade natatória é subdividida em sustentada, prolongada e explosão. A natação sustentada é aquela que o peixe mantém sua natação por um período, não excedendo 200 min, sem entrar em fadiga. A determinação da natação prolongada é mensurada pelo teste da velocidade crítica de natação (*Ucrit*) (SANTOS et al., 2007), criado por Brett (1964), onde o animal entra em fadiga entre 20 seg. e 200 min. Brett em seu estudo analisou o metabolismo respiratório e o desempenho natatório de uma espécie de salmão (*Oncorhynchus nerka*). Ainda, a natação de explosão envolve movimentos rápidos de curta duração, sendo inferior a 15-20 seg., (SANTOS et al., 2012), com os animais entrando em fadiga por estarem nas velocidades mais altas a qual são capazes de nadar (BEAMISH, 1978). A velocidade crítica de natação (*Ucrit*) é comumente utilizada para avaliar efeitos de diversos fatores na capacidade de natação dos peixes, como por exemplo, temperatura (BRETT, 1967; PANG et al., 2014), pH (BUTLER et al., 1992), oxigênio (FERREIRA et al., 2010), na tentativa de prever efeitos ecológicos a esses animais em seu habitat natural (PLAUT, 2001). Além desses efeitos, a análise toxicológica de poluentes ganhou destaque no trabalho de Beaumont et al. (1995) ao utilizar *Ucrit* como um dos parâmetros na determinação da concentração sub-letal de adultos de truta marrom (*Salmo trutta*) expostos ao cobre, e de Cunningham e Mcgeer (2016) ao analisarem a capacidade de duas espécies de peixes (*Salmo trutta* e *Coregonus clupeaformis*) tinham de executar mergulhos repetitivos após exposição crônica ao cádmio.

A eletrorretinografia (ERG) é um método não-invasivo que permite analisar a atividade eletrofisiológica da retina (MAKHANKOV et al., 2004). É mensurada pela indução da variação de potenciais de ação das células que respondem a um estímulo luminoso quando o animal está anestesiado, sendo necessário o uso de três eletrodos para o registro dos potenciais elétricos da retina: i. eletrodo positivo, colocado sob a córnea, ii. negativo ou de referência, colocado subcutaneamente no dorso do animal, e iii. eletrodo terra, que serve de zero e é colocado no recipiente que comporta o animal anestesiado (LIMA, 2011).

Os peixes podem passar também por análise de parâmetros zootécnicos, indicador morfológico, comprimento médio final, dado em centímetros, e medido pela distância entre o a ponta do focinho até a extremidade da nadadeira caudal, ganho de peso dado em gramas e calculado pela subtração do peso médio final e peso médio inicial (AYZORA et al., 2011; BACCARIN, 2002; NAKANDAKARE, 2010;

SOARES, 2012). Esses dados podem indicar o efeito de diversas substâncias que entram em contato com os animais na biota aquática e que podem estar envolvidas também no seu bem-estar fisiológico, sendo de importante relevância o seu estudo.

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

Avaliar os efeitos tóxicos da tiroxina livre (T_4), complexada à ciclodextrina e levotiroxina nos parâmetros biológicos de tambaqui (*Colossoma macropomum*), ainda avaliar se a complexação com a ciclodextrina torna a T_4 mais tóxica em relação aos parâmetros biológicos analisados, e construir um dispositivo para a determinação da capacidade natatória em peixes com possível aplicação em testes toxicológicos.

3.2. Objetivos Específicos

- Desenvolver o complexo de inclusão entre ciclodextrina e tiroxina;
- Avaliar os efeitos da tiroxina livre, complexada à ciclodextrina e da levotiroxina como disruptores endócrinos em concentrações encontradas em água tratada e não tratada em teste de toxicidade crônica;
- Analisar o efeito da tiroxina livre e complexada à ciclodextrina e da levotiroxina nos parâmetros zootécnicos de *Colossoma macropomum* durante o teste de toxicidade crônica;
- Estudar os efeitos tóxicos dos hormônios descritos sobre o comportamento dos peixes;
- Analisar os efeitos tóxicos dos hormônios descritos na taxa metabólica e consumo de oxigênio dos animais;
- Avaliar os efeitos tóxicos sobre a atividade da retina dos peixes por eletrorretinografia fotópica e fotometria *flicker*, as células fotorreceptoras e ON-bipolares;
- Desenvolver um dispositivo para determinação da capacidade natatória de peixes, com aplicação na área toxicológica.

4. Referências

ABDALLAH, M. A. M. Endocrine disruptors as pollutants in marine ecosystem: a case study in Egypt. *The Open Biotechnology Journal*, v. 10, p. 131-150, 2016.

ABDEL-MONEIM, A. M.; AL-KAHTANI, M. A.; ELMENSHAWY, O. M. Histopathological biomarkers in gills and liver of *Oreochromis niloticus* from polluted wetland environments, Saudi Arabia. *Chemosphere*, v. 88, p. 1028-1035, 2012.

AIRES, M. M. *Fisiologia*. Guanabara Koogan, p. 1055-1078, 2012.

AJAY, K. N. The Effect of L–Thyroxine on Metabolic Parameters in Newly Diagnosed Primary Hypothyroidism. *Clinical and Experimental Pharmacology*, v. 3, n. 3, p. 2-4, 2013.

ARAÚJO, L. D. et al. Efeito de banhos terapêuticos com formalina sobre indicadores de estresse em tambaqui. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.39, n.3, p.217-221, 2004.

ARBELÁEZ-ROJAS G. A. et al. Composição Corporal de Tambaqui, *Colossoma macropomum*, e Matrinxã, *Brycon cephalus*, em Sistemas de Cultivo Intensivo, em Igarapé, e Semi-Intensivo, em Viveiros. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 31, n.3, p.1059-1069, 2002.

AREZON, A. Manual sobre toxicidade em efluentes industriais. Porto Alegre: *Conselho do Meio Ambiente*, p, 1-42, 2011.

ARIDE, P. H. R.; ROUBACH, R.; VAL, A. L. Tolerance response of tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier) to water Ph. *Aquaculture Research*, v. 38, p. 588-594, 2007.

ARIDE, P. H. R. et al. Tambaqui growth and survival when exposed to different photoperiods. *Acta Amazonica*, v. 36, n. 3, p. 381-384, 2006.

ARTHUR, J. R.; BECKETT, G. J. Thyroid function. *British Medical Bulletin*, v. 55, n. 3, p. 658-668, 1999.

AYROZA, L. M. S. et al. Custos e rentabilidade da produção de juvenis de tilápia-do-nilo em tanques-rede utilizando-se diferentes densidades de estocagem. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 40, n. 2, p. 231-239, 2011.

BACCARIN, A. E. Impacto ambiental e parâmetros zootécnicos da produção de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) sob diferentes manejos alimentares. 2002. 66 f. Tese (Doutorado em Aqüicultura) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2002.

BARBAS, L. A. L. et al. Properties of two plant extractives as anaesthetics and antioxidants for juvenile tambaqui *Colossoma macropomum*. *Aquaculture*, v. 469, 79-87, 2017.

BARBOSA, A. C. et al. Avaliação da taxa metabólica do tambaqui (*Colossoma macropomum*) e da tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*). *Revista Brasileira de Engenharia de Pesca*, v. 4, n. 2, p. 46-55, 2009.

BEAMISH, F. W. H. *Swimming capacity*. In: *Fish physiology*, v. 7, Academic Press, New York. p. 101-187, 1978.

BEAUMONT, M. W., BUTLER, P. J., TAYLOR, E. W. Exposure of brown trout, *Salmo trutta*, to sub-lethal copper concentrations in soft acidic water and its effect upon sustained swimming performance. *Aquatic Toxicology*, v. 33, p. 45-63, 1995.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. *Revista Química Nova*, v. 30, n. 3, p.652, 2007.

BORGES, A. Parâmetros de qualidade do pacu (*Piaractus mesopotamicus*), tambaqui (*Colossoma macropomum*) e do seu híbrido eviscerados e estocados em gelo. 2013. 222 f. Tese (Doutorado em Higiene Veterinária e Processamento) - Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2013.

BRETT, J. R. Swimming performance of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) in relation to fatigue time and temperature. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, v. 24, n. 8, p. 1731-1741, 1967.

BRETT, J. R. The respiratory metabolism and swimming performance of young sockeye salmon. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, v. 21, n. 5, p. 1183-1226, 1964.

BUTLER, P. J., DAY, N., NAMBA, K. Interactive effects of seasonal temperature and low pH on resting oxygen uptake and swimming performance of adult brown trout (*Salmo trutta*). *Journal of Experimental Biology*, v.165, p. 195-212, 1992.

CADENA, P. G. et al. Physical-chemical parameters and validation of a colorimetric method for deoxycholic and ursodeoxycholic acids: kit reagent and optical sensor. *Chemistry and Physics of Lipids*, v. 164, n. 2, p. 1-7, 2011.

CHENG, J. et al. Preparation and properties of octenyl succinate b-cyclodextrin and its application as an emulsion stabilizer. *Food Chemistry*, v. 218, p. 116–121, 2017.

COLBORN, T.; VOM SAAL, F. S.; SOTO, A. M. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environmental Health Perspectives*, v. 101, n. 5, p. 378-384, 1993.

CORREIO POPULAR. *Dia nacional dos medicamentos genéricos, 2015*. Disponível em: http://correio.rac.com.br/especiais_correio/genericos.pdf. Acesso: 17 de junho de 2015.

COSTA, C. R. C. P. et al. Toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. *Revista Química Nova*, v. 31, n. 7, p. 1820-1830, 2008.

CUNNINGHAM, J. L., MCGEER, J. C. The effects of chronic cadmium exposure on repeat swimming performance and anaerobic metabolism in brown trout (*Salmo trutta*) and lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*). *Aquatic Toxicology*, v. 173, p. 9-18, 2016.

DAIRIKI, J. K.; SILVA, T. B. A. Revisão de literatura: exigências nutricionais do tabaqui – compilação de trabalhos, formulação de ração adequada e desafios futuros. Manaus: *Embrapa Amazônia Ocidental*, p. 1-48, 2011.

DARBRE, P. D. *Endocrine disruption and human health*. Elsevier, p. 1-390, 2015.

DEL-CLARO, K. *Comportamento animal: uma introdução à ecologia comportamental*. Livraria Conceito, p. 14-16, 2004.

Eltroxin tablets: levotiroxina comprimidos 50 mcg, 100 mcg. New Zealand Data Sheet, p. 1-8, 2014. *Bula de remédio*.

FABER, J. et al. Urinary excretion of free and conjugated 3',5'-diiodothyronine and 3,3'-diiodothyronine. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v. 53, n. 3, p. 587-593, 1981.

FARIAS, J. G.; BESSA, E.; ARNT, A. M. Comportamento animal no ensino de Biologia: possibilidades e alternativas a partir da análise de livros didáticos de Ensino Médio. *Revista Electrónica de Enseñanza de las Ciencias*, v. 11, n. 2, p. 365-384, 2012.

FENT, K.; WESTON, A. A.; CAMINADA, D. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology*, v. 76, p. 122–159, 2006.

FERREIRA, A. P. Ocorrência e detecção de desreguladores endócrinos em estações de tratamento de esgoto: complicações ao meio ambiente. *Revista Brasileira de Farmácia*, v. 93, n.2, p. 255-264, 2012.

FERREIRA, M. S., OLIVEIRA, A. M., VAL, A. L. Velocidade crítica de natação (*Ucrit*) de matrinxã (*Brycon amazonicus*) após exposição à hipóxia. *Acta Amazonica*, v. 40, n. 4, p. 699-704, 2010.

FIÚZA, L. S. Effects of salinity on the growth, survival, haematological parameters and osmoregulation of tambaqui *Colossoma macropomum* juveniles. *Aquaculture Research*, v. 46, p. 1-9, 2015.

FONTENELE, E. G. P. et al. Contaminantes ambientais e os interferentes endócrinos. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*, v. 54, n. 1, p. 6-16, 2010.

FRACETO, L. F. et al. Caracterização do complexo de inclusão ropivacaína: β -ciclodextrina. *Revista Química Nova*, v. 30, n. 5, p. 1203-1207, 2007.

FUHRMAN, V. F.; TAL, A.; ARNON, S. Why endocrine disrupting chemicals (EDCs) challenge traditional risk assessment and how to respond. *Journal of Hazardous Materials*, v. 286, p. 589-611, 2015.

GALLEGO, V. et al. Fish sperm subpopulations: Changes after cryopreservation process and relationship with fertilization success in tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Theriogenology*, v. 87, p. 16-24, 2017.

GARG, S. K. Effect of oral administration of L-thyroxine (T₄) on growth performance, digestibility, and nutrient retention in *Channa punctatus* (Bloch) and *Heteropneustes fossilis* (Bloch). *Fish Physiology and Biochemistry*, v. 33, p. 347–358, 2007.

GHISELLI, G.; JARDIM, W. F. Interferentes endócrinos no ambiente. *Revista Química Nova*, v. 30, n. 3, p.695, 2007.

GOULDING, M.; CARVALHO, M. L. Life history and management of the tambaqui (*Colossoma macropomum*, Characidae): an important Amazonian food fish. *Revista Brasileira de Zoologia*, v. 1, n. 2, p. 107-133, 1982.

GROFF, A. A. O tambaqui (*Colossoma macropomum*) e o pirarucu (*Arapaima gigas*) como organismos bioindicadores do efeito genotóxico da radiação ultravioleta (UVA e UVB). 2008. 77 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

GUIMARÃES, J. R. P. F. *Disruptores endócrinos no meio ambiente: um problema de saúde pública e ocupacional*. 2005. Disponível em: <http://acpo.org.br/biblioteca/01_artigos_dissertacoes_teses_manuais/artigos/joao_roberto.pdf>. Acessado: 18/12/2015.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. *Tratado de fisiologia médica*. 13ed. Elsevier, p 931-91-943, 2017.

HAMPL, R.; KUBÁTOVÁ, J.; STÁRKA, L. Steroids and endocrine disruptors—History, recent state of art and open questions. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, p. 1-7, 2014.

KHETAN, S. K. *Endocrine disruptors in the environment*. Publicação online, p. 1-26, 2014.

KOCHHANN, D. et al. Linking hematological, biochemical, genotoxic, and behavioral responses to crude oil in the amazon fish *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1816). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 65, p. 266-275, 2013.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística [IBGE], 2013. *Produção da Pecuária Municipal 2013*, v. 41. Rio de Janeiro: IBGE. P. 1-108. Disponível: ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Pecuaria/Producao_da_Pecuaria_Municipal/2013/ppm_2013.pdf. Acesso: 08/02/2017.

INTERFARMA, *Venda de medicamento sobe 12% no primeiro trimestre*. 2015. Disponível em: http://www.interfarma.org.br/noticias_detalhe.php?id=605.

JERÔNIMO, G. T. et al., *Neoechinorhynchus buttnerae* (Acanthocephala) infection in farmed *Colossoma macropomum*: A pathological approach. *Aquaculture*, v. 469, p. 124-127, 2017.

KURKOV, S. V.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins. *International Journal of Pharmaceutics*, p. 1-13, 2013.

LAKKAKULA, J. et al. Detailed investigation of a cyclodextrin inclusion complex with lthyroxine for improved pharmaceutical formulations. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, v. 74, n. 14, p. 397-405, 2012.

LIMA, C. M. A importância da electroretinografia para o diagnóstico de Retinopatias caninas. 2011. 141 f. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária, Lisboa, 2011.

LOFTSSON, T. Formulation of Drug-Cyclodextrin Complexes. In: DRAGICEVIC. N., MAIBACH, HOWARD I. *Percutaneous Penetration Enhancers Chemical Methods in Penetration Enhancement*, Springer, p. 189-205, 2015.

LOFTSSON, T.; BREWSTER, M. E. Cyclodextrins as Functional Excipients: Methods to Enhance Complexation Efficiency. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 101, n. 9, p. 3019-3032, 2012.

LOFTSSON, T.; BREWSTER, M. E. Pharmaceutical applications of cyclodextrins: basic science and product development. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 62, p. 1607–1621, 2010.

MADEIRA, I. R. Hipotireoidismo congênito e desenvolvimento. *Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto*, UERJ, Ano 10, 2011.

MAKHANKOV, Y. V., RINNER, O., NEUHAUSS, S.C.F. An inexpensive device for noninvasive electroretinography in small aquatic vertebrates. *J. Neurosci. Methods*, v. 135, p. 205–210, 2004.

MARCON J. M. e FILHO D. W. Antioxidant processes of the wild tambaqui, *Colossoma macropomum* (Osteichthyes, Serrasalminidae) from the Amazon. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, v. 123, p. 257–263, 1999.

MATOS, L. V. et al. Morphological and histochemical changes associated with massive infection by *Neoechinorhynchus buttnerae* (Acanthocephala:

Neoechinorhynchidae) in the farmed freshwater fish *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818 from the Amazon State, Brazil. *Parasitology Research*, Publicação online, p. 1-9, 2017.

Medicines and Healthcare products Regulatory Agency (MRHA). *Levothyroxine: a review of clinical and quality considerations*. Disponível em: https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/420997/CHM_Review_for_MHRA_website_Levothyroxine_sodium_FINAL_04_Jan_2013.pdf. Acesso: 29 de dezembro de 2016.

MESSIAS, E. R. R.; CARMONA, M. J. C.; AULER JÚNIOR, J. O. C. Hormônios Tireóideos A Cirurgia Cardíaca. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, v. 49, n. 6, p. 1-9, 1999.

MENDONÇA, P. P. Morphometrical development of tambaqui (*Colossoma macropomum*, Cuvier, 1818) under different photoperiods. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.41, n.6, p.1337-1341, 2012.

MENDONÇA, P. P. et al. Efeito da suplementação de fitase na alimentação de juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Arquivos de Zootecnia*, v.61, n. 235, p. 437-448, 2012.

MICHALSKA, P. et al. Inclusion complex of ITH12674 with 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin: Preparation, physical characterization and pharmacological effect. *Carbohydrate Polymers*, v. 157, p. 94–104, 2017.

NAKANDAKARE, I. B. Inclusão de probióticos no processamento de ração para tilápia do nilo, *Oreochromis niloticus* variedade gift. 2010. 74 f. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura e Pesca) - Instituto de Pesca, São Paulo, 2010.

NUNES, M. T. Hormônios tireoideanos: mecanismo de ação e importância biológica. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, v. 47, n. 6, p. 640, 2003.

OLIVEIRA, V.; MALDONADO, R. R. Hipotireoidismo e hipertireoidismo – uma breve revisão sobre as disfunções tireoidianas. *Interciência e Sociedade*, v. 3, n. 2, p. 36-44, 2014.

OTERO, A. P. S. et al. Thyroid gland development in *Rachycentron canadum* during early life stages. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 86, n. 3, p. 1507-1515, 2014.

PANG, X. et al. The effects of fasting on swimming performance in juvenile qingbo (*Spinibarbus sinensis*) at two temperatures. *Journal of Thermal Biology*, v. 42, p. 25-32, 2014.

PEREIRA JUNIOR G. P. et al. Desempenho produtivo de juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum* CUVIER, 1818) alimentados com rações contendo farinha de crueira de mandioca (*Manihot esculenta*, CRANTZ) em substituição ao milho (*Zea mays*). *Acta Amazonica*, v. 43, n, 2, p. 217-226, 2013.

PINHO, E. et al. Cyclodextrins as encapsulation agents for plant bioactive compounds. *Carbohydrate Polymers*, v. 101, p. 121-135, 2014.

PLAUT, I. Critical swimming speed: its ecological relevance. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, v. 131, p. 41-50, 2001.

POLLONI-SILVA, J. et al. Remediation efficiency of three treatments on water polluted with endocrine disruptors: Assessment by means of in vitro techniques. *Chemosphere*, v. 173, p. 267-274, 2017.

POWER, D. M. et al. Thyroid hormones in growth and development of fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, v. 130, p. 447-459, 2001.

RAVEN, P. H.; JOHNSON, G. B. *Biology*. McGraw-Hill, 6 ed, p. 1125-1146, 2002.

REIDY, S. P.; KERR, S. R.; NELSON, J. A. Aerobic and anaerobic swimming performance of individual Atlantic cod. *The Journal of Experimental Biology*, v. 203, p. 347-357, 2000.

REIS FILHO, R. W.; ARAÚJO, J. C.; VIEIRA, E. M. Hormônios sexuais estrógenos: contaminantes bioativos. *Revista Química Nova*, v. 29, n. 4, p. 817-822, 2006.

RODRIGUES, A. P. O. Nutrição e alimentação do tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Boletim do Instituto de Pesca*, São Paulo, v. 40, n. 1, p. 135-145, 2014.

RUBINGER, C. F. *Seleção de métodos biológicos para a avaliação toxicológica de efluentes industriais*. 2009. 89 f. Dissertação (Mestrado em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.

SADAUSKAS-HENRIQUE, H. et al. Validation of a suite of biomarkers of fish health in the tropical bioindicator species, tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Ecological Indicators*, v. 73, p. 443-451, 2017.

SALAZAR-LUGO, R. et al. Paraquat and temperature affect nonspecific immune response of *Colossoma macropomum*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 27, p. 321-326, 2009.

SANTOS, H. A. et al. Optimal swim speeds by respirometer: an analysis of three neotropical species. *Neotropical Ichthyology*, v. 10, n. 4, p. 805-811, 2012.

SANTOS, H. A., POMPEU, P. S., MARTINEZ, C. B. A Importância do estudo da capacidade natatória de peixes para a conservação de ambientes aquáticos neotropicais. *Revista Brasileira de Recursos Hídricos*, v. 12, n. 3, p. 141-149, 2007.

SCHIVIANI, J. A.; CARDOSO, C. E.; RODRIGUES, W. C. Desreguladores Endócrinos no Meio Ambiente e o Uso de Potenciais Bioindicadores. *Revista Eletrônica TECCEN, Vassouras*, v. 4, n. 3, p. 33-48, 2011.

SCHMIDT-NIELSEN, K. *Fisiologia animal: adaptação e meio ambiente*. Santos, p. 497-531, 2010.

SILVA, M. C.; CONFORTI, V. A. Disruptores endócrinos. *Enciclopédia Biosfera*, v.9, n.17; p. 1098-1111, 2013.

SOARES, K. L. S. Análise da influência de diferentes sistemas de cultivo sobre o crescimento e as proteínas do sistema digestório de *Oreochromis niloticus*, L. 2012. 81 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2012.

SOARES, P. R. L. et al. Acute and chronic toxicity of the benzoylurea pesticide, lufenuron, in the fish, *Colossoma macropomum*. *Chemosphere*, v. 161, p. 412-421, 2016.

SOUZA, A. S. Análise de desenvolvimento do tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier) 1818 (Pisces, Serrasalmidae), utilizando a massa de mandioca branca, *Manihot esculenta* (Crantz) como complemento alimentar em viveiros de piscicultura em área de várzea. 2009. 79 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, 2009.

SVANFELT, J. et al. Analysis of thyroid hormones in raw and treated waste water. *Journal of Chromatography A*, v. 1217, p. 6469–6474, 2010.

TAVARES-DIAS, M. *Manejo e sanidade de peixes em cultivo*, Embrapa, p. 226-247, 2009.

TALWAR, G. P.; SRIVASTAVA, L.M. *Textbook of Biochemistry and Human Biology*, 3ed, New Delhi, p. 847, 2006.

TIERNEY, K. B. Swimming Performance Assessment in Fishes. *Journal of Visualized Experiments*, v. 51, p. 1-4, 2011.

U.S. Food and Drug Administration (FDA). *Levotiroxina - FDA prescrevendo informações, efeitos colaterais e usos*. Disponível em: <https://www.drugs.com/pro/levothyroxine.html>. Acesso: 29 de dezembro de 2016.

VARELA JUNIOR, A. S. *Criopreservação seminal de tambaqui, Colossoma macropomum*. 2011. 118 f. Tese (Doutorado em Aquicultura) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2011.

VELMURUGAN, M.; KARIKALAN, N.; CHEN, S.; DAI, Z. Studies on the influence of b-cyclodextrin on graphene oxide and its synergistic activity to the electrochemical detection of nitrobenzene. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 490, p. 365–371, 2017.

VESTEL, J. et al. Use of acute and chronic ecotoxicity data in environmental risk assessment of pharmaceuticals. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 35, n. 5, p. 1201-1212, 2016.

WARD, L. S. Levotiroxina e o problema da permutabilidade de drogas de estreito intervalo terapêutico. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, v. 55, n. 7, p. 429-434, 2011.

Capítulo 1

Efeitos tóxicos da tiroxina livre, complexada à ciclodextrina e levotiroxina nos parâmetros biológicos do *Colossoma macropomum* exposto a teste de toxicidade crônica

[Toxic effects of free thyroxine, complexed into cyclodextrin and levothyroxine in the biological parameters of *Colossoma macropomum* exposed to chronic toxicity test]

Resumo

Os efeitos tóxicos da tiroxina (T_4) livre, complexada à β -ciclodextrina (β -CD- T_4) e da levotiroxina (L- T_4) nos parâmetros biológicos de tambaqui (*Colossoma macropomum*) foram avaliados. Os animais foram expostos em testes de toxicidade crônica aos hormônios nas concentrações de água não tratada (ANT - 60 ng/L) por 2 meses e água tratada (AT - 20 ng/L e 40 ng/L) por 12 meses. Foram avaliados, o peso e comprimento, comportamento animal, taxa metabólica, consumo de oxigênio e eletrorretinografia. Os juvenis de tambaqui expostos ao β -CD- T_4 (ANT) apresentaram redução ($p < 0,05$) no peso comparado aos demais grupos (14,1% - controle e T_4 , e 13,21% - L- T_4) e comprimento (5,71%) comparado a T_4 livre. Os animais expostos a T_4 livre (AT) apresentaram aumento (8,48%) no crescimento em peso ($p < 0,05$). Nas observações comportamentais dos animais expostos a L- T_4 (ANT) foi observada redução ($p < 0,05$) nos eventos Nadar Lento e Permanecer Parado. Animais expostos ao β -CD- T_4 (ANT) reduziram a exibição do evento Nadar Lento e Fugir, mas aumentaram a exibição de Permanecer Parado. Os animais expostos ao β -CD- T_4 (20 ng/L - AT) aumentaram a exibição do evento Ataque Lateral. Não foram observadas diferenças na taxa metabólica, porém os animais expostos ao complexo β -CD- T_4 (40 e 60 ng/L) apresentaram maior consumo de O_2 . L- T_4 e β -CD- T_4 promoveram redução na capacidade dos animais em responderem a estímulos nos fotorreceptores e nas células ON-bipolares de acordo com o exame fotópico. No eletrorretinograma *flicker* não foram observadas alterações ($p > 0,05$) na latência e amplitude das ondas. Pode-se concluir que a complexação de T_4 à β -CD alterou a toxicidade do hormônio, promovendo alterações no peso, comprimento, comportamento e consumo de O_2 dos animais, sugerindo que produtos disponibilizados com complexos de inclusão, devem ser submetidos a novos testes de toxicidade.

33 *Palavras-chave:* Disruptor endócrino, Hormônio tireoidiano, Complexo de inclusão,
34 Metabolismo, Comportamento animal.

35 **Abstract**

36 The toxic effects of free thyroxine (T_4), complexed into β -cyclodextrin (β -CD- T_4) and
37 levothyroxine (L- T_4) on the biological parameters of tambaqui (*Colossoma*
38 *macropomum*) were evaluated. The animals were exposed in a chronic toxicity test to
39 the compounds at the concentrations of untreated water (ANT – 60 ng/L) for 2 months
40 and treated water (AT – 20 ng/L and 40 ng/L) for 12 months. Weight and length, animal
41 behavior, metabolic rate, oxygen consumption and electroretinography were evaluated.
42 The juvenile tambaqui were exposed to β -CD- T_4 in ANT had a reduction ($p < 0,05$) in
43 the weight compared to the other groups (14.1% - control and T_4 and 13.21% - L- T_4)
44 and length (5.71%) compared to free T_4 . Besides, the animals exposed to free T_4 in AT
45 had an increase (8.48%) in weight gain ($p < 0.05$). Behavioral observations of the
46 animals exposed to L- T_4 in ANT showed a reduction ($p < 0.05$) in the Slow Swimming
47 and Staying Motionless events. The animals exposed to the β -CD- T_4 (ANT) reduced the
48 display of the Slow Swimming and Escape event, but increased the Staying Motionless.
49 The animals exposed to β -CD- T_4 (20 ng/L - AT) increased the Lateral Attack event. No
50 significant differences ($p > 0.05$) were observed in the metabolic rate, but the animals
51 exposed to the β -CD- T_4 complex (40 and 60 ng/L) had the highest O_2 consumption. L-
52 T_4 and β -CD- T_4 promoted a reduction in the ability of the animals to respond to stimuli
53 in the photoreceptors and ON-bipolar cells according to the photopic examination. In
54 flicker electroretinogram, no differences ($p > 0.05$) were observed in the latency and
55 wave amplitude. It can be concluded that the complexation of T_4 to β -CD altered the
56 toxicity of the hormone, promoting changes in the weight, length, behavior and oxygen
57 consumption of the exposed animals, suggesting that new toxicity tests should be
58 performed on the hormones available containing inclusion complexes with
59 cyclodextrins.

60 *Keywords:* Endocrine disruptor, Thyroid hormone, Inclusion complex, Metabolism,
61 Animal behavior.

62 **1. Introdução**

63 O hormônio tiroxina (T_4) e sua forma ativa, a triiodotironina (T_3), são
64 sintetizados e liberados pela glândula tireoide tendo efeito no crescimento,

65 desenvolvimento e função dos principais tecidos dos animais (Ajay, 2013), ainda
66 ajudam a regular o metabolismo, o consumo de energia e a termogênese, estando
67 envolvidos também no desenvolvimento de órgãos sensoriais como os olhos e ouvidos
68 (Darbre, 2015). Na aquicultura, o hormônio T_4 é utilizado como aditivo alimentar,
69 sendo administrado oralmente quando associado à ração (Garg, 2007). Quando há
70 disfunção da glândula tireoide na produção e secreção destes hormônios tireoidianos
71 pode ser necessário a reposição a partir de formas sintéticas da T_4 como a Levotiroxina
72 (L- T_4) (Lakkakula et al., 2012). Devido ao hipotireoidismo, a L- T_4 pode ser utilizada
73 durante toda a vida do indivíduo (Madeira, 2011) sendo o quarto medicamento mais
74 vendido no Brasil (Correio popular, 2015). Adicionalmente, T_4 devido a sua
75 característica hidrofóbica foi complexado à ciclodextrina (CD) para reduzir essa
76 limitação (Lakkakula et al., 2012).

77 As CDs podem formar complexos de inclusão com várias substâncias
78 aumentando assim a biodisponibilidade, absorção, solubilidade em água e estabilidade
79 química destas (Cadena et al., 2011; Loftsson, 2015). CDs são oligossacarídeos cíclicos,
80 formados por monômeros de glicose, unidos por ligações glicosídicas α -(1,4), com
81 cavidade hidrofóbica e exterior hidrofílico que quando em solução aquosa incorpora a
82 sua cavidade as moléculas hidrofóbicas formando complexos de inclusão (Loftsson e
83 Brewster, 2010; Loftsson, 2015). Não apresentam efeito tóxico quando administradas
84 por via oral em medicamentos, devido à pouca absorção pelo trato gastrointestinal e
85 eliminação na sua forma inalterada na excreção (Loftsson e Brewster, 2012), e ainda
86 protegem as moléculas bioativas de efeitos ambientais secundários como temperatura,
87 pH e luz (Pinho et al., 2014). Mas, devido às alterações das propriedades físico-
88 químicas descritas acima das moléculas complexadas não são conhecidos os efeitos
89 tóxicos destes novos compostos. Segundo Loftsson e Brewster (2010), em 2010 havia
90 mais de 35 medicamentos disponíveis no mercado a base de CDs.

91 Devido à utilização de hormônios tireoidianos livres e complexados a CDs, bem
92 como a sua forma sintética (L- T_4), pode ocorrer o descarte destas substâncias no
93 ambiente, neste caso, são considerados disruptores endócrinos (DEs), que são
94 substâncias químicas naturais ou sintéticas capazes de imitar ou interferir na ligação e
95 na ação dos hormônios naturais do corpo, interferindo assim nos processos fisiológicos
96 (Abdallah, 2016). Os fármacos entram no sistema aquático por diferentes maneiras. A

97 origem da contaminação é antropogênica devido ao descarte no lixo doméstico e
98 hospitalar ou esgoto comum. Segundo Fent et al. (2006), a principal contaminação se dá
99 através da ingestão de medicamentos pelos seres humanos, posteriormente os seus
100 metabólitos são eliminados pela excreção, desembocando diretamente no ambiente
101 aquático ou chegando nas águas residuais por limitações na remoção de fármacos
102 encontradas nos sistemas de tratamento de água (Svanfelt et al., 2010), onde passam por
103 uma sequência de clarificação, tanque de aeração, adição de cloreto de ferro para
104 eliminação de fosfato e outra clarificação (Ternes, 1998). Se tratando especificamente
105 de T₄, embora Svanfelt et al. (2010) tenham determinado os valores aproximados de 60
106 e 20 ng/L de T₄ em água não tratada e água tratada, respectivamente, a literatura é
107 escassa quanto aos trabalhos que avaliam seu efeito toxicológico na biota aquática.

108 Primeiramente analisamos a toxicidade do hormônio 17β-estradiol livre (E₂) e
109 complexado a β-ciclodextrina sobre os parâmetros biológicos de *Oreochromis niloticus*
110 (Silva et al., 2017). E₂ livre e complexado a CD apresentaram efeitos tóxicos diferentes
111 nos peixes a níveis comportamentais e fisiológicos. Já existem trabalhos que utilizam
112 complexos T₄-CD (Lakkakula et al., 2012; Patente US005856359) o que leva uma
113 prerrogativa do surgimento de possíveis produtos no mercado e a necessidade de avaliar
114 os efeitos tóxicos destes novos complexos de inclusão.

115 Diante da problemática acima apresentada, faz-se necessário o desenvolvimento
116 de estudos que analisem o efeito da T₄ livre, complexada a β-CD e da levotiroxina em
117 peixes como modelo animal, avaliando como tais substâncias afetam os sistemas
118 biológicos e se esses animais são sensíveis à presença de produtos químicos no
119 ambiente aquático. A espécie *Colossoma macropomum* (tambaqui) pode apresentar-se
120 como um bom modelo para ensaios ecotoxicológicos por ser utilizada em estudos como
121 bioindicadores de qualidade ambiental (Soares et al., 2016). O tambaqui é um peixe da
122 bacia amazônica, distribuído pela América do Sul, tem carne bastante apreciada (Dairiki
123 e Silva, 2011). No ano de 2013 foi uma das espécies mais cultivadas do Brasil tendo
124 produção total de 88.719 toneladas (IBGE, 2013).

125 Estudos sobre a toxicidade de T₄, L-T₄ e β-CD em *C. macropomum* não foram
126 encontrados na literatura. Por ser um peixe com ampla distribuição e comercialização
127 no Brasil, utilizado para alimentação, tendo seu potencial aumentado quanto aos riscos
128 que pode causar à saúde pela bioacumulação, é importante analisar os possíveis efeitos

129 tóxicos causados por DEs nesses animais. Diante disso, o presente trabalho teve como
130 objetivo avaliar os efeitos tóxicos do hormônio tiroxina livre e complexada a β -
131 ciclodextrina e da levotiroxina sobre os parâmetros biológicos tais como peso,
132 comprimento, comportamento e taxa metabólica de *Colossoma macropomum*
133 (tambaqui) e ainda avaliar se a complexação com a ciclodextrina torna a T₄ mais tóxica
134 em relação aos parâmetros biológicos analisados.

135 **2. Materiais e métodos**

136 *2.1. Manutenção*

137 Os protocolos utilizados no trabalho foram aprovados pela Comissão de Ética
138 no Uso de Animais (CEUA), processo n. 096/2014. Os juvenis de tambaqui (*Colossoma*
139 *macropomum*) foram obtidos da Estação de Aquicultura Continental Professor Johei
140 Koike – Departamento de Pesca da Universidade Federal Rural de Pernambuco
141 (UFRPE) onde eram mantidos em tanques (pH 6,6 e temperatura de 28 ± 1 °C),
142 transferidos para aquários no Laboratório de Ecofisiologia e Comportamento Animal
143 (LECA) - Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal (DMFA) da mesma
144 instituição. Os juvenis foram aclimatados em aquários com volume final de 20 L com
145 aeração contínua (11 mg/L de OD) em água desclorada com pH 6,8, temperatura de 26
146 ± 1 °C e em fotoperíodo natural de 12:12 claro/escuro durante todos os experimentos,
147 variando apenas no teste crônico de 12 meses devido a passagem pelas quatro estações
148 do ano. Os peixes foram alimentados uma vez ao dia com ração comercial extrusada
149 (40% de proteína bruta). Foram realizados 2 testes de toxicidade crônica: i. simulando
150 concentração de T₄ em água não tratada (ANT - 2 meses), com 4 grupos experimentais
151 (controle, T₄ a 60 ng/L, L-T₄ a 60ng/L e β -CD-T₄ a 60 ng/L); ii. simulando
152 concentração de T₄ em água tratada (AT - 12 meses), com 5 grupos experimentais
153 (controle, T₄ a 20 ng/L, L-T₄ a 20ng/L, β -CD-T₄ a 20 ng/L e β -CD-T₄ a 40 ng/L). Em
154 nenhum dos testes houve morte de animais nos grupos.

155 *2.2. Formação do complexo de inclusão entre tiroxina e β -ciclodextrina*

156 A tiroxina (T₄) (lote #BCBL 8063V) e a β -ciclodextrina (β -CD) (lote 1228922
157 44606048) foram obtidas da SIGMA (St. Luiz MO, USA), a levotiroxina (L-T₄) foi
158 obtida no comércio local (composição: L-T₄ (37,5 μ g), manitol, amido de milho,
159 celulose microcristalina, butil-hidroxianisol e estearato de magnésio). Para a preparação
160 das soluções de T₄ e L-T₄, estas foram dissolvidas em etanol e posteriormente diluídas

161 em água destilada seguido de evaporação do álcool obtendo-se concentração de 4,0 x
162 10^{-3} g/L. O complexo de inclusão entre a tiroxina e a β -ciclodextrina (β -CD- T_4) foi
163 formado pela técnica de co-precipitação segundo Lakkakula et al. (2012), na qual a T_4
164 foi diluída em uma solução aquosa de β -CD na proporção de 1:1 em mol (β -
165 CD:hóspede). A β -CD foi primeiramente solubilizada em água destilada enquanto a
166 solução de T_4 foi preparada conforme mencionado acima. A solução de T_4 foi
167 adicionada a de β -CD sob suave agitação para permitir a formação do complexo de
168 inclusão. Todas as soluções foram acondicionadas sob refrigeração (4 °C) e utilizadas
169 periodicamente sempre que feita a renovação da água dos aquários.

170 2.3. *Teste de toxicidade crônica simulando concentração de água não tratada (ANT)*

171 A determinação das concentrações experimentais para o teste de toxicidade
172 crônica simulou a concentração encontrada em água não tratada segundo Svanfelt et al.
173 (2010) de aproximadamente 60 ng/L de T_4 . Tabaquis juvenis (28 animais, peso médio
174 $3,00 \pm 0,82$ g e comprimento médio $5,84 \pm 0,29$) foram divididos em 4 grupos, contendo
175 7 animais expostos as concentrações de 60 ng/L de T_4 livre, L- T_4 , e complexo de
176 inclusão β -CD- T_4 , e ainda um grupo controle sem adição de nenhum composto. As
177 concentrações acima foram obtidas a partir da diluição das soluções descritas no item
178 2.2 e repostas na água uma vez por semana com a lavagem completa dos aquários, com
179 a água passando por processo oxidativo avançado (POA), em reator utilizando foto-
180 oxidação UV e H_2O antes do descarte. O ensaio foi realizado em sistema semi-estático
181 durante 2 meses, com os animais sendo alimentados diariamente (*ad libitum*) até a
182 saciedade com 0,15 g de ração comercial extrusada. Os efeitos sub-letais analisados
183 foram as alterações no peso e comprimento (item 2.5.1.), no comportamento animal
184 (item 2.5.2.), na taxa metabólica, no consumo de oxigênio (item 2.5.3.),
185 eletrorretinograma fotópico e *flicker* (item 2.5.4.).

186 2.4. *Teste de toxicidade crônica simulando concentração de água tratada (AT)*

187 As concentrações experimentais para este teste de toxicidade crônica também
188 seguiram os resultados encontrados por Svanfelt et al. (2010), sendo o valor aproximado
189 de 20 ng/L de T_4 em água tratada. Os juvenis de tabaqui (35 animais, peso médio $9,57$
190 $\pm 0,28$ g e comprimento médio $8,35 \pm 0,08$) foram divididos em 5 grupos com 7 animais
191 cada, expostos as concentrações de 20 ng/L de T_4 livre, L- T_4 , complexo de inclusão β -
192 CD- T_4 , e 40 ng/L também do complexo β -CD- T_4 , e ainda um grupo controle sem adição

193 de nenhum composto. As concentrações acima foram obtidas a partir da diluição das
194 soluções descritas no item 2.2 e repostas na água uma vez por semana com a lavagem
195 completa dos aquários, com a água passando por processo oxidativo avançado (POA),
196 em reator utilizando foto-oxidação UV e H₂O antes do descarte. O ensaio foi realizado
197 em sistema semi-estático durante 12 meses, com os animais sendo alimentados
198 diariamente (*ad libitum*) até a saciedade com 0,7 g de ração comercial extrusada, sendo
199 aumentada 0,3 g a cada trimestre. Os efeitos sub-letais analisados foram as alterações no
200 peso e comprimento (item 2.5.1.), no comportamento animal (item 2.5.2.), na taxa
201 metabólica e no consumo de oxigênio (item 2.5.3.).

202 2.5. Coleta de dados

203 2.5.1. Medidas de peso e comprimento

204 A verificação do peso (g) e comprimento (extremidade do nariz até extremidade
205 da cauda em cm) dos animais foi realizada segundo Soares et al. (2016), tendo a
206 primeira medição na semana de início de cada teste e quinzenalmente repetidas
207 utilizando balança e paquímetro analítico.

208 2.5.2. Estudos comportamentais

209 Os padrões comportamentais para *C. macropomum* foram observados seguindo
210 o etograma construído por Soares et al. (2016), com adição do comportamento
211 Compulsão Alimentar (CA) no qual o animal realiza o ato de se alimentar sem a
212 presença de alimento. As observações foram feitas semanalmente, com o observador a
213 1,5 m de distância do aquário para não influenciar no comportamento dos animais, pelo
214 método de *scan sampling* (ALTMANN, 1974; SOARES et al., 2016) durante 30 min
215 intercalando-se um minuto de observação e um minuto de intervalo.

216 2.5.3. Determinação da taxa metabólica e consumo de oxigênio

217 Para a determinação da taxa metabólica (consumo de O₂ em massa), foi utilizado
218 o método desenvolvido por Cunha et al. (2009) modificado, no qual o sistema de
219 aeração é desligado e a abertura do aquário vedada para bloquear a renovação de O₂
220 pelo ar atmosférico. Um período de 30 seg. foi adotado para a estabilização do medidor
221 de oxigênio dissolvido portátil (pHtec DO-48), e após isso aferiu-se a cada 5 min o OD
222 (oxigênio dissolvido) por um tempo total de 30 min. As determinações foram realizadas
223 quinzenalmente durante os dois meses no teste de ANT, e nos 3 últimos meses (10 a 12
224 meses) no teste de AT. A taxa metabólica (mg O₂ L⁻¹) para cada grupo foi determinada

conforme Cunha et al. (2015) seguindo a equação: $TM = [(O_i - O_f) \times V / (T \times B)]$, onde O_i corresponde a concentração inicial de oxigênio (mg O_2/L), O_f corresponde a concentração final de oxigênio (mg O_2/L), V é o volume do aquário, B é a biomassa dos peixes (g), e T é a duração da medição (h).

2.5.4. Eletrorretinograma (ERG) Fotópico e Flicker

As análises foram realizadas ao final do experimento do teste de toxicidade crônica simulando concentração de água não tratada (ANT), utilizando animais anestesiados (60 mg/L de eugenol). Para as análises da atividade dos cones na retina de *C. macropomum in vivo*, utilizou-se a técnica de eletrorretinografia fotópica descrita por Soares et al. (2016). O exame fotópico foi realizado em sala com aproximadamente 30 cd/m^2 . Cinco estímulos visuais de 3 cd/m^2 (0,7 Hz) foram usados para as medidas fotópicas. Ainda, realizamos o eletrorretinograma *flicker*, com 20 estímulos de luz branca a 30 Hz em condições fotópicas para avaliar a atividade dos cones (principalmente retina central). O sistema usado foi o Neuropack 2 MEB-7102A/k da Nihon Kohdem.

2.7. Análises estatísticas

Os resultados foram expressos na forma de média e desvio padrão, sendo comparados por análise de variância simples (*One way ANOVA*). Quando as diferenças foram significativas, as médias foram comparadas pelo Teste de Tukey com $p < 0,05$ através do software Origin Pro 2015 Academic (*Origin Lab Corporation*, EUA).

3. Resultados

3.1. Medidas de peso e comprimento

As médias de peso e comprimento dos animais expostos em teste de toxicidade crônica a ANT a AT e a AT são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Efeito da tiroxina livre (T_4 Livre), levotiroxina (L- T_4) e tiroxina complexada a ciclodextrina (β -CD- T_4) no crescimento em peso e comprimento do tambaqui (*Colossoma macropomum*) durante 2 meses de exposição ao teste de toxicidade crônica simulando a concentração de tiroxina presente em água não tratada (ANT), e trimestralmente durante 12 meses de exposição ao teste de toxicidade crônica simulando a concentração de tiroxina presente em água tratada (AT).

Animais expostos em teste de toxicidade crônica simulando T_4 em água não tratada (ANT)				
Peso médio (g) N = 28				
Meses	Grupos	T_4 Livre (60 ng/L)	L- T_4 (60 ng/L)	β -CD- T_4 (60 ng/L)
	Controle			

0 - 2	3,06 ± 0,14 ^a	3,06 ± 0,12 ^a	3,03 ± 0,18 ^a	2,63 ± 0,12^b	
Comprimento médio (cm)					
0 - 2	6,08 ± 0,03 ^a	6,14 ± 0,04^{ab}	6,01 ± 0,06 ^a	5,79 ± 0,05^{ac}	
<i>Animais expostos em teste de toxicidade crônica simulando T₄ em água tratada (AT)</i>					
Peso médio (g) N = 35					
Meses	Grupos Controle	T ₄ Livre (20 ng/L)	L- T ₄ (20 ng/L)	β-CD-T ₄ (20 ng/L)	β-CD-T ₄ (40 ng/L)
0 - 3	12,34 ± 1,84 ^a	11,69 ± 1,81 ^a	12,37 ± 1,92 ^a	12,29 ± 1,58 ^a	12,11 ± 1,65 ^a
4 - 6	15,95 ± 1,89 ^a	14,76 ± 2,17 ^a	15,25 ± 2,23 ^a	14,95 ± 2,80 ^a	15,10 ± 1,24 ^a
7 - 9	22,02 ± 1,92 ^a	20,76 ± 3,06 ^a	23,53 ± 3,14 ^a	24,88 ± 3,08 ^a	23,81 ± 3,02 ^a
10 - 12	28,00 ± 2,64 ^a	28,66 ± 2,40 ^{ab}	30,70 ± 2,30 ^{ab}	33,00 ± 2,25^{bc}	30,71 ± 2,35 ^{ab}
Comprimento médio (cm)					
0 - 3	9,20 ± 0,61 ^a	9,07 ± 0,61 ^a	9,23 ± 0,62 ^a	9,22 ± 0,69 ^a	9,27 ± 0,66 ^a
4 - 6	10,09 ± 0,31 ^a	9,89 ± 0,30 ^a	10,16 ± 0,36 ^a	10,07 ± 0,47 ^a	10,07 ± 0,29 ^a
7 - 9	11,11 ± 0,58 ^a	10,94 ± 0,76 ^a	11,44 ± 0,73 ^a	11,59 ± 0,60 ^a	11,30 ± 0,73 ^a
10 - 12	12,33 ± 0,39 ^a	12,51 ± 0,42 ^a	12,87 ± 0,37 ^a	12,92 ± 0,29 ^a	12,85 ± 0,61 ^a

254 * Letras distintas na horizontal diferem significativamente de acordo com o Teste de Tukey ($p < 0,05$).

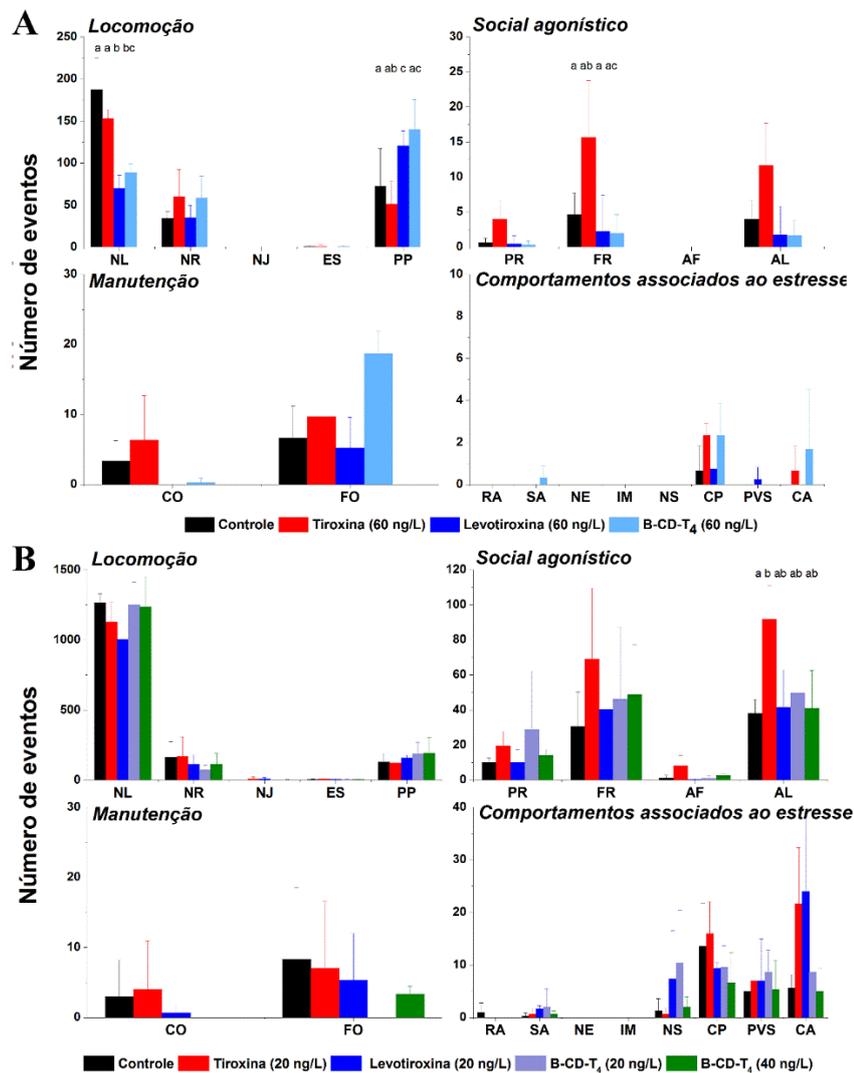
255 Os animais expostos ao β-CD-T₄ (ANT) por 2 meses apresentaram redução
256 significativa ($p < 0,05$) no peso comparado aos demais grupos (14,1% comparado ao
257 controle e a T₄, e 13,21% comparado a L-T₄) (Tab. 1). Em relação ao comprimento, os
258 animais expostos a T₄ livre e β-CD-T₄ (ANT) apresentaram diferença entre si. A
259 complexação com a ciclodextrina reduziu o crescimento em comprimento dos animais
260 em 5,71% (Tab. 1).

261 Em relação ao teste de toxicidade crônica por 12 meses de exposição (AT), não
262 foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) no crescimento em peso entre os
263 grupos estudados nos 10 primeiros meses de exposição, após isso (10-12 meses) foi
264 observado um aumento significativo ($p < 0,05$) de 8,48% no peso dos animais expostos
265 a 20 ng/L de β-CD-T₄ em relação ao grupo controle. Não foram observadas diferenças
266 significativas ($p > 0,05$) no comprimento dos grupos estudados (Tab. 1).

267 3.2. Estudos comportamentais

268 Os resultados das observações comportamentais dos animais expostos em teste
269 de toxicidade crônica a ANT e a AT são apresentados nas Fig. 1A e 1B,
270 respectivamente.

271 Nos animais expostos a L-T₄ e ao β-CD-T₄ por 2 meses (ANT), foi observado
 272 redução significativa ($p < 0,05$) no evento Nadar Lento (Categoria Locomoção)
 273 comparados ao controle e a T₄ (Fig. 1A). Ainda, foi observado nos animais expostos a
 274 L-T₄ um aumento significativo ($p < 0,05$) no evento Permanecer Parado (Categoria
 275 Locomoção) comparados aos grupos controle e T₄, enquanto nos animais expostos a β-
 276 CD-T₄ foi observado um aumento significativo ($p < 0,05$) neste evento comparado a T₄.
 277 Na Categoria Social Agonístico, foi observado uma redução significativa ($p < 0,05$) nos
 278 animais expostos a β-CD-T₄ (ANT) no evento Fugir comparado a T₄.



279 **Figura 1.** Eventos comportamentais em juvenis de *Colossoma macropomum* expostos em teste de
 280 toxicidade crônica simulando a concentração de tiroxina presente em ANT (A) durante 2 meses de
 281 exposição, e teste de toxicidade crônica simulando a concentração de tiroxina presente em AT (B) durante
 282 12 meses de exposição. Os eventos são: NL – Nadar Lento; NR - Nadar Rápido; NJ – Nadar Junto; ES -
 283 Emergir e Submergir; PP - Permanecer Parado; PR - Perseguir; FR - Fugir; AF - Ataque Frontal; AL -
 284

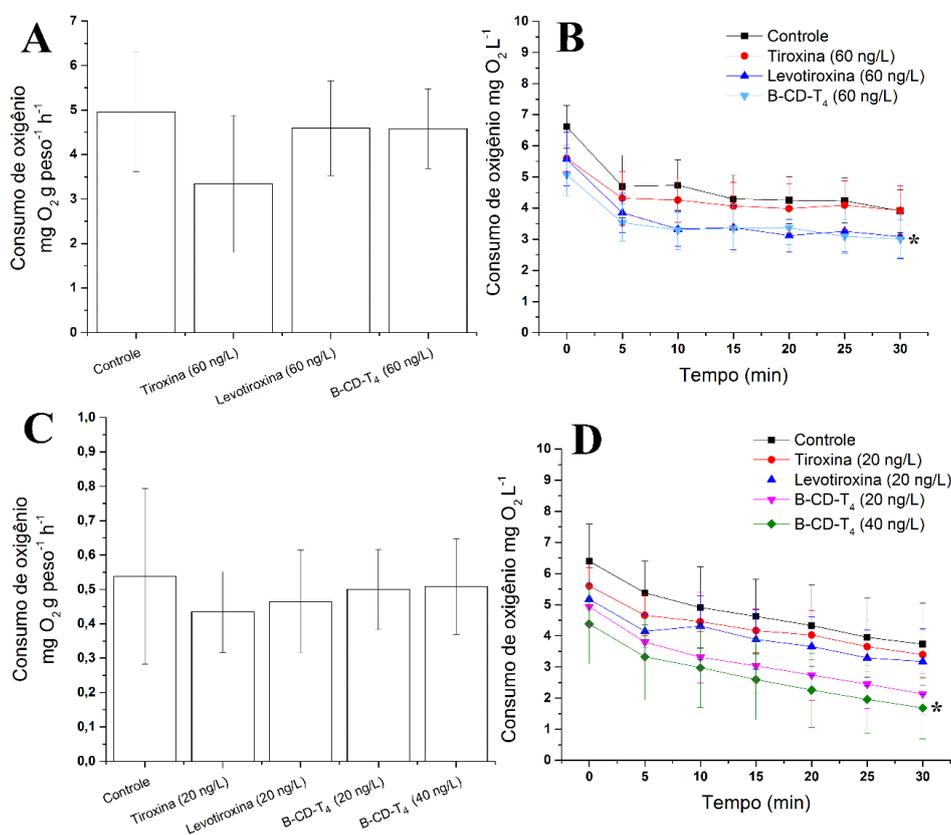
285 Ataque Lateral; CO - Comer; FO - Forragear; RA - Respiração Aérea; SA - Saltar; NE - Natação Errática;
 286 IM - Imóvel; NS - Natação Superficial; CP - Coprofagia; PVS - Permanecer verticalmente na superfície;
 287 CA – Compulsão Alimentar. * Letras distintas diferem significativamente de acordo com o Teste de
 288 Tukey ($p < 0,05$).

289 Nas demais Categorias (Manutenção e Comportamentos Associados ao Estresse)
 290 não foram observadas diferenças significativas. No entanto, o evento Saltar foi
 291 apresentado apenas pelos animais expostos ao β -CD- T_4 , Permanecer Verticalmente na
 292 Superfície foi apresentado apenas pelos animais expostos a L- T_4 , e Compulsão
 293 Alimentar foi apresentado pelos animais expostos a T_4 e ao β -CD- T_4 (Fig. 1A).
 294 Observa-se que o grupo controle não apresentou os comportamentos descritos acima
 295 que podem estar relacionados a situações de estresse.

296 Nos animais expostos ao β -CD- T_4 (20 ng/L) por 12 meses (AT), foi observado
 297 aumento significativo ($p < 0,05$) apenas no evento Ataque Lateral (Categoria Social
 298 Agonístico) comparado ao grupo controle (Fig. 1B).

299 3.3. Determinação da taxa metabólica e consumo de oxigênio

300 Os resultados de determinação da taxa metabólica dos animais expostos em teste
 301 de toxicidade a ANT são apresentados na Fig. 2A e 2B e os resultados dos animais
 302 submetidos a AT são apresentados na Fig. 2C e 2D.

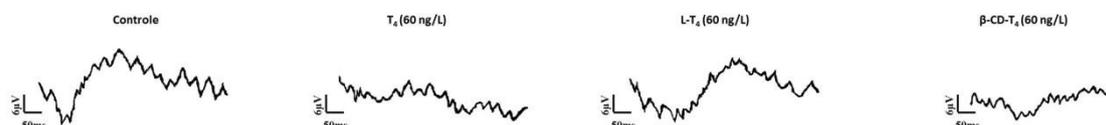


304 **Figura 2.** Taxa metabólica e consumo de oxigênio em juvenis de *Colossoma macropomum* expostos em
 305 teste de toxicidade crônica a tiroxina, tiroxina complexada a ciclodextrina e levotiroxina simulando a
 306 concentração do hormônio presente em ANT (A e B) durante 2 meses de exposição e em AT (C e D) em
 307 função de cada tratamento aplicado nos três últimos meses do experimento (10-12 meses). A e C
 308 representam a taxa metabólica para cada grupo experimental; B e D representam o consumo de oxigênio
 309 para cada grupo experimental ao longo de 30 minutos. *Diferença significativa ($p < 0,05$) observada no
 310 consumo de oxigênio em 30 min dos animais expostos ao complexo β -CD- T_4 a 60 ng/L (B) e β -CD- T_4 a
 311 40 ng/L (D) em relação aos animais expostos a T_4 livre e Controle.

312 Não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) na taxa metabólica
 313 nos animais expostos as concentrações de T_4 , β -CD- T_4 e L- T_4 no teste de toxicidade
 314 crônica simulando ANT por 2 meses e em AT por 12 meses. Entretanto, no consumo de
 315 oxigênio ao longo do tempo dos animais expostos em ANT (2B), foi observado redução
 316 do oxigênio dissolvido na água em todos os grupos (Controle = 30,77%; T_4 = 18,19%;
 317 L- T_4 = 63,63%; β -CD- T_4 40 ng/L = 30%), bem como em AT (Controle = 15,39%; T_4 =
 318 36,37%; L- T_4 = 36,54%; β -CD- T_4 20 ng/L = 50%; β -CD- T_4 40 ng/L = 55,56%).
 319 Adicionalmente, foi observada redução significativa ($p < 0,05$) no consumo de oxigênio
 320 ao longo do tempo (30 min) dos animais expostos ao complexo β -CD- T_4 a 60 ng/L (Fig.
 321 2B) e β -CD- T_4 a 40 ng/L (Fig. 2D) em relação aos animais expostos a T_4 livre e ao
 322 Controle, indicando que mesmo sem haver alteração na taxa metabólica dos animais,
 323 houve maior consumo de oxigênio quando expostos aos complexos de inclusão nas
 324 maiores concentrações (40 e 60 ng/L - AT e ANT, respectivamente).

325 3.4. Eletrorretinograma (ERG) Fotópico e Flicker

326 O eletrorretinograma fotópico padrão de tambaqui do grupo controle e dos
 327 grupos expostos a T_4 e suas derivações em teste de toxicidade a ANT são apresentados
 328 na Fig. 3. As médias da latência e amplitude do exame fotópico e flicker dos grupos
 329 experimentais são apresentadas na Tab. 2.



330 **Figura 3.** Eletrorretinograma fotópico de *Colossoma macropomum* *in vivo* em ensaio de toxicidade
 331 crônica simulando concentrações de T_4 em água não tratada (ANT). Latência e amplitude das ondas *a* e *b*
 332 são mostradas.
 333

334 **Tabela 2.** Efeitos da tiroxina livre (T₄ Livre), levotiroxina (L- T₄) e tiroxina complexada a ciclodextrina
 335 (β-CD-T₄) a 60 ng/L no exame fotópico e *flicker*, latência e amplitude das ondas, em *Collossoma*
 336 *macropomum* em teste de toxicidade crônica simulando concentração de água não tratada (ANT) após 2
 337 meses de exposição.

Exame Fotópico				
Grupos	Latência (ms)		Amplitude (μV)	
	Onda a	Onda b	Onda a	Onda b
Controle	43,80 ± 29,98 ^a	213,00 ± 48,45 ^a	4,41 ± 2,89 ^a	21,12 ± 6,91 ^a
T ₄ L	101,00 ± 1,41 ^a	236,00 ± 86,26 ^a	6,70 ± 5,09 ^a	14,70 ± 4,24 ^a
L-T ₄	165,66 ± 49,31 ^b	307,33 ± 36,82 ^a	9,39 ± 4,76 ^a	12,86 ± 2,17 ^a
β-CD-T ₄	135,66 ± 59,53 ^b	275,66 ± 36,69 ^a	2,13 ± 1,61 ^a	9,32 ± 4,49 ^b

Exame <i>Flicker</i>		
Grupos	Latência (ms)	Amplitude (μV)
Controle	33,66 ± 0,45 ^a	4,66 ± 1,46 ^a
T ₄ L	33,87 ± 0,17 ^a	2,98 ± 1,44 ^a
L-T ₄	33,72 ± 0,25 ^a	4,09 ± 1,95 ^a
β-CD-T ₄	33,97 ± 0,91 ^a	2,80 ± 0,33 ^a

338 * Letras distintas diferem significativamente de acordo com o Teste de Tukey (p < 0,05).

339 Na análise dos resultados do exame fotópico foram observadas diferenças
 340 significativas (p < 0,05) na latência da onda *a* dos grupos experimentais expostos a L-T₄
 341 e a β-CD-T₄. Sendo 3,78 vezes maior em L-T₄ do e 3,09 vezes maior em β-CD-T₄ do
 342 que no controle, respectivamente. Ainda, foi observada diferença significativa (p <
 343 0,05) no grupo exposto a β-CD-T₄ na amplitude da onda *b*, sendo 2,26 vezes menor em
 344 β-CD-T₄ do que no controle. Após análise dos resultados do eletrorretinograma *flicker*,
 345 não foram observadas diferenças significativas (p > 0,05) na latência e na amplitude das
 346 ondas em todos os grupos estudados.

347 4. Discussão

348 Nosso estudo é pioneiro na área toxicológica por avaliar os efeitos tóxicos sub-
 349 letais do tabaqui exposto a tiroxina e suas derivações (levotiroxina e complexos de
 350 inclusão com β-ciclodextrina) no crescimento em peso e comprimento, comportamento,
 351 taxa metabólica, consumo de oxigênio e eletroretinografia em diferentes tempos de
 352 exposição e tratamentos (2 e 12 meses). Existem trabalhos na literatura com
 353 administração exógena, por via injetável (1 ou 10 mg/Kg) (Khalil et al., 2011) ou oral
 354 (20 – 150 mg/Kg) (Garg, 2007) de tiroxina em peixes. Estas concentrações são muito

355 superiores àquelas descritas por Svanfelt et al. (2010) que são encontradas na água
356 como poluente ambiental (até 60 ng/L). Garg (2007) relata que houve crescimento em
357 peso em *Channa punctatus* e *Heteropneustes fossilis* na concentração de 50 mg/Kg,
358 porém, as maiores concentrações (100 – 150 mg/Kg) exibiram efeitos tóxicos. Khalil et
359 al. (2011) também relataram aumento no crescimento em peso e comprimento das
360 larvas de *Oreochromis niloticus* expostas à T₄ em concentrações 10 vezes menores que
361 as apresentadas por Garg (2007) como tóxicas. No presente estudo, a relação da redução
362 no crescimento em peso, e conseqüentemente redução no comprimento apresentada
363 pelos animais expostos ao complexo β-CD-T₄ na maior concentração (60 ng/L - ANT)
364 (Tab. 1), pode ser justificada por uma intoxicação dos animais como foi observado por
365 Garg (2007) em dosagens ainda maiores (> 50 mg/kg). Animais intoxicados podem ter
366 aumento do efeito catabólico (Garg, 2007) diante de uma possível metabolização do
367 agente intoxicante, que pode prejudicar o seu desenvolvimento.

368 Mesmo não sendo observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) no presente
369 trabalho em relação a taxa metabólica (Fig. 3A), houve aumento no consumo de
370 oxigênio dos animais expostos ao complexo β-CD-T₄ (Fig. 3B), o que poderia justificar
371 este efeito catabólico. Os resultados relatados por Garg (2007) não puderam ser
372 diretamente comparados com o nosso estudo pois a via de administração utilizada foi a
373 oral, enquanto que trabalhamos com a via cutânea por imersão. Independentemente do
374 tempo de exposição ao complexo β-CD-T₄, houve crescimento em peso (Tab. 1) na
375 menor concentração (20 ng/L), não foi observada diferença em 40 ng/L (Tab. 1) em
376 relação ao controle, e houve uma redução do peso nos expostos a 60 ng/L (Tab. 1). Isto
377 parece indicar que a maior concentração exibiu efeitos tóxicos no desenvolvimento do
378 animal.

379 Nas observações comportamentais em ambos os testes, simulando concentrações
380 de T₄ em águas não tratada e tratada, as respostas biológicas analisadas podem ser sinais
381 iniciais de modificações comportamentais relacionadas ao estresse animal pela ação dos
382 hormônios como DEs (Snowdon, 1999). Ainda, as CDs, segundo Loftsson e Brewster
383 (2012) e Loftsson (2015) apresentam baixa toxicidade, porém quando complexadas a
384 outras substâncias mudam as características físico-químicas das moléculas hospedadas
385 como a estabilidade, o que poderia interferir também na sua toxicidade. Isto pode ser

386 observado em nosso estudo devido às mudanças comportamentais significativas ($p <$
387 $0,05$) apresentadas pelos peixes comparando a exposição de T_4 a β -CD- T_4 (Fig. 1A).

388 Em relação a L- T_4 a 60 ng/L (ANT), esta demonstrou ser mais tóxica que a T_4
389 pela redução na exibição do evento Nadar Lento, o comportamento mais frequente dos
390 animais neste teste, e ainda redução do evento Permanecer Parado, provavelmente por
391 ser mais estável que a T_4 livre (Garg, 2007). Da mesma forma, a complexação com a
392 ciclodextrina também poderia aumentar a toxicidade do hormônio pelos motivos já
393 mencionados acima, isto foi observado na redução da exibição dos eventos Nadar Lento
394 e Fugir, comportamentos ativos, e aumento do evento Permanecer Parado, que é um
395 indicador do estado de inatividade. Animais quando intoxicados por poluentes presentes
396 na água tendem a apresentar mais eventos de comportamentos relacionados à
397 inatividade (Santos et al., 2016).

398 Os efeitos observados acima na maior concentração (60 ng/L) e no menor tempo
399 de exposição (2 meses) não foram encontrados no maior tempo de exposição (12 meses)
400 com concentrações menores (20 e 40 ng/L). Isto pode indicar 2 estratégias: i. Que os
401 animais podem ter se aclimatado aos efeitos tóxicos sub-letais em relação ao
402 comportamento; ii. Que a menor concentração não provoca efeitos tóxicos. Mesmo os
403 animais expostos a T_4 por 12 meses apresentando maior exibição do comportamento
404 Ataque lateral, não podemos indicar que T_4 se mostrou mais tóxica pela alteração deste
405 comportamento. Devido ao maior adensamento dos animais no aquário ao longo do
406 tempo, isto pode ter forçado o aparecimento de hierarquias sociais como encontrado por
407 Maclean e Metcalfe (2001) utilizando juvenil de salmão do Atlântico, e não o efeito
408 tóxico de exposição ao hormônio. Desta forma, as concentrações de T_4 quantificadas
409 por Svanfelt et al. (2010) em água tratada (AT), tomadas como base para a realização do
410 nosso trabalho, indicou que a exposição de juvenis de *C. macropmum* a menor
411 concentração ambiental não se mostrou tóxica.

412 Observando os efeitos da T_4 e suas derivações em relação a taxa metabólica, os
413 grupos experimentais não diferiram estatisticamente entre si ($p > 0,05$). Ainda, o nível
414 de oxigênio dissolvido (OD) na água não foi inferior a 1,0 mg/L, podendo estar dentro
415 do nível mínimo de oxigênio dissolvido para esta espécie, que de acordo com Barbosa
416 et al. (2009) é de 1 a 3 mg/L. Asseguramos assim que os animais não entraram em
417 estado de hipóxia, e que as alterações exibidas pelos animais em relação ao consumo de

418 oxigênio estariam potencialmente relacionadas à exposição química ao hormônio
419 testado. Foi demonstrado (Fig. 3B e 3D) que o complexo β -CD- T_4 interferiu ($p < 0,05$)
420 no aumento do consumo de oxigênio pelos animais expostos às maiores concentrações
421 (40 ng/L - AT e 60 ng/L - ANT), isto pode estar relacionado ao efeito tóxico deste
422 complexo de inclusão.

423 O aumento da latência da onda *a* nos grupos expostos a L- T_4 e β -CD- T_4 bem
424 como a redução da amplitude da onda *b* no grupo β -CD- T_4 , encontradas no exame de
425 eletroretinografia fotópica podem mostrar uma redução progressiva na atividade das
426 células fotorreceptores e ON-bipolares da retina. Soares et al. (2016) encontraram
427 resultados semelhantes ao submeterem o *C. macropomum* à exposição de lufenuron.
428 Isto indica que as células da retina de *C. macropomum* podem apresentar uma gama de
429 receptores que atenuam ou amplificam as respostas eletrofisiológicas a diversos
430 compostos químicos tóxicos.

431 **5. Conclusão**

432 O presente estudo é pioneiro na área toxicológica, tendo os efeitos da T_4 e suas
433 derivações (levotiroxina e complexo de inclusão) estudados sobre os parâmetros
434 biológicos de *Colossoma macropomum* realizando testes de toxicidade crônica com
435 concentrações simulando T_4 em água não tratada e água tratada em diferentes períodos
436 de tempo. Observou-se que a redução no crescimento em peso e comprimento e os
437 eventos comportamentais inativos foram exibidos pelos animais expostos a maior
438 concentração do complexo de inclusão, causando também uma maior redução do nível
439 de O_2 dissolvido na água dos aquários. Pode-se concluir que a complexação de T_4 à β -
440 CD alterou a toxicidade do hormônio em 60 ng/L tornando esta forma de apresentação
441 do hormônio mais tóxica em relação aos parâmetros estudados. Os resultados
442 encontrados alertam para que os produtos farmacêuticos disponibilizados com
443 complexos de inclusão devam ser submetidos a testes de toxicidade antes de sua
444 comercialização para garantir uma maior segurança de uso por populações humanas.

445 **Agradecimentos**

446 Os autores agradecem à Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), a
447 Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de
448 estudos, ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq - #477215/2013-0) e a Fundação de

449 Apoio à Pesquisa do Estado de Pernambuco (FACEPE - #APQ-0933-2.08/15) pelo
450 auxílio financeiro.

451 **Referências**

452 ABDALLAH, M. A. M. Endocrine disruptors as pollutants in marine ecosystem: a case
453 study in Egypt. *The Open Biotechnology Journal*, v. 10, p. 131-150, 2016.

454

455 AJAY, K. N. The Effect of L–Thyroxine on Metabolic Parameters in Newly Diagnosed
456 Primary Hypothyroidism. *Clin. Exp. Pharmacol. P.*, v. 3, n. 3, p. 2-4, 2013.

457

458 ALTMANN, J. Observational study of behavior: sampling methods. *Behaviour*, v.49,
459 p.227-267, 1974.

460

461 BARBOSA, A. C. et al. Avaliação da taxa metabólica do tambaqui (*Colossoma*
462 *macropomum*) e da tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*). *Rev. Bras. Eng. Pesca*, v. 4,
463 n. 2, p. 46-55, 2009.

464

465 CADENA, P. G. et al. Physical-chemical parameters and validation of a colorimetric
466 method for deoxycholic and ursodeoxycholic acids: kit reagent and optical sensor.
467 *Chem. Phys. Lipids.*, v. 164, n. 2, p. 100, 2011.

468

469 CORREIO POPULAR. *Dia nacional dos medicamentos genéricos, 2015*. Disponível
470 em: http://correio.rac.com.br/especiais_correio/genericos.pdf.

471

472 CUNHA, V. L. et al. Consumo de oxigênio pós-prandial de juvenis do pampo
473 *Trachinotus marginatus*. *Ciênc. Rural*, v.39, n.4, p.1257-1259, 2009.

474

475 DAIRIKI, J. K.; SILVA, T. B. A. Revisão de literatura: exigências nutricionais do
476 tambaqui – compilação de trabalhos, formulação de ração adequada e desafios futuros.
477 Manaus: *Embrapa Amazônia Ocidental*, p. 1-48, 2011.

478

479 DARBRE, P. D. Disrupters of Thyroid Hormone Action and Synthesis. In: Darbre.
480 (Org.). *Endocrine disruption and human health*. L: Elsevier, p. 92-107, 2015.

481

482 FENT, K. et al. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquat. Toxicol.*, v. 76, p.
483 122–159, 2006.

484

485 GARG, S. K. Effect of oral administration of L-thyroxine (T4) on growth performance,
486 digestibility, and nutrient retention in *Channa punctatus* (Bloch) and *Heteropneustes*
487 *fossilis* (Bloch). *Fish Physiol. Biochem.*, v. 33, p. 347–358, 2007.

488

489 Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística [IBGE], 2014. *Produção da Pecuária*
490 *Municipal 2013*, v. 41. Rio de Janeiro: IBGE. P. 1-108. Disponível:
491 [ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Pecuaria/Producao_da_Pecuaria_Municipal/2013/ppm20](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Pecuaria/Producao_da_Pecuaria_Municipal/2013/ppm2013.pdf)
492 [13.pdf](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Pecuaria/Producao_da_Pecuaria_Municipal/2013/ppm2013.pdf). Acesso: 08/02/2017.

493

494 KHALIL, N. A. et al. The effect of maternal thyroxine injection on growth, survival and
495 development of the digestive system of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, larvae. *Adv.*
496 *Biosc. Biotechnol.*, v. 2, p. 320-329, 2011.

497

498 LAKKAKULA, J. et al. Detailed investigation of a γ cyclodextrin inclusion complex
499 with lthyroxine for improved pharmaceutical formulations. *J. Incl. Phenom. Macro.*, v.
500 74, n. 14, p. 397-405, 2012.

501

502 LOFTSSON, T. Formulation of Drug-Cyclodextrin Complexes. In: DRAGICEVIC. N.,
503 MAIBACH, HOWARD I. *Percutaneous Penetration Enhancers Chemical Methods in*
504 *Penetration Enhancement*, Springer, p. 189-205, 2015.

505

506 LOFTSSON, T.; BREWSTER, M. E. Cyclodextrins as Functional Excipients: Methods
507 to Enhance Complexation Efficiency. *J. Pharm. Sci.*, v. 101, n. 9, p. 3019-3032, 2012.

508

509 LOFTSSON, T.; BREWSTER, M. E. Pharmaceutical applications of cyclodextrins:
510 basic science and product development. *J. Pharm. Pharmacol.*, v. 62, p. 1607–1621,
511 2010.

512

- 513 MACLEAN, A.; METCALFE, N. B. Social status, access to food, and compensatory
514 growth in the juvenile Atlantic salmon. *J. Fish Biol.*, v. 58, p. 1331-1346, 2001.
- 515
- 516 MADEIRA, I. R. Hipotireoidismo congênito e desenvolvimento. *Revista Hospital*
517 *Universitário Pedro Ernesto*, UERJ, Ano 10, 2011.
- 518
- 519 PINHO, E. et al. Cyclodextrins as encapsulation agents for plant bioactive compounds.
520 *Carbohydr. Polym.*, v. 101, p. 121-135, 2014.
- 521
- 522 SANTOS, B. D. et al. Efeitos de hormônios esteroides de contraceptivos orais
523 combinados sobre os parâmetros comportamentais de *Betta splendens* (Regan, 1909),
524 *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.68, n.2, p.387-396, 2016.
- 525
- 526 SILVA, M. C. G. et al. Avaliação do impacto causado pela disponibilidade de 17 β -
527 estradiol livre ou complexado à β -ciclodextrina no ambiente aquático sobre
528 *Oreochromis niloticus* (tilápia). *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, Article in Press, 2017.
- 529
- 530 SNOWDON, C. T. O significado da pesquisa em Comportamento Animal. *Estud.*
531 *Psicol.*, v. 4, n. 2, p. 365-373, 1999.
- 532
- 533 SOARES, P. R. L. et al. Acute and chronic toxicity of the benzoylurea pesticide,
534 lufenuron, in the fish, *Colossoma macropomum*. *Chemosphere*, v. 161, p. 412-421,
535 2016.
- 536
- 537 SVANFELT, J. et al. Analysis of thyroid hormones in raw and treated waste water. *J.*
538 *Chromatogr. A*, v. 1217, p. 6469–6474, 2010.
- 539
- 540 TERNES, T. A. Occurrence of drugs in german sewage Treatment plants and rivers.
541 *Wat. Res.*, v. 32, n. 11, p. 3245-3260, 1998.

Capítulo 2



Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2016 017034 6

DISPOSITIVO PORTÁTIL TIPO TÚNEL DE NATAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE NATATÓRIA EM ANIMAIS AQUÁTICOS

RELATÓRIO DESCRITIVO

Campo da Invenção

[001] O presente pedido de patente de invenção descreve um dispositivo portátil tipo túnel de natação para a determinação da capacidade natatória em animais aquáticos, que compreende um tubo transparente com tela de proteção em ambos os lados, com suporte para entrada do animal, ligado por tubulações a um sensor de fluxo de água acoplado a um sistema eletrônico com arduíno e *display* de visualização da velocidade de fluxo de água e bomba acoplada a reservatório de circulação de água. Este dispositivo pode ser utilizado na determinação da capacidade natatória sob diferentes parâmetros físico-químicos, presença de fármacos ou outros produtos químicos com aplicação no desenvolvimento de medicamentos ou testes toxicológicos.

Antecedentes da Invenção

[002] O aumento da investigação relacionada ao comportamento de natação dos peixes vem ganhando maior dimensão nos últimos anos devido aos impactos ambientais sofridos por organismos aquáticos em seu habitat natural (SANTOS et al., *Rev. Bras. Rec. Híd.* 12:144-149, 2007). Os testes de capacidade natatória têm ganhado importância nos

estudos de energética molecular, mecânica de natação, trocas gasosas, fisiologia cardíaca, doenças, poluição, hipóxia e temperatura (TIERNEY, *J. Vis. Exp.* 51(e2572):1-4, 2011). Movimentos de natação dos peixes desempenham uma atividade vital para sua sobrevivência, seja na fuga de predadores, busca de presas, migração, momento reprodutivo, e também na fuga em caso de desequilíbrio ambiental (REIDY et al., *J. Exp. Biol.* 203:347–357, 2000). Diante disto, torna-se importante desenvolver dispositivos que consigam determinar este parâmetro de forma rápida e com precisão, pois os dispositivos encontrados no mercado são grandes necessitando de grandes áreas, tem estruturas complexas e não portáteis, sendo necessário mão-de-obra para a montagem e instalação, além de não permitirem análises *in situ*.

[003] Os dispositivos construídos para o teste de determinação da capacidade natatória em ambiente laboratorial são grandes como o apresentado por Santos et al., (*Rev. Bras. Rec. Híd.* 12:3, 2007), precisando de reservatórios de água que comporte a capacidade do dispositivo, neste caso de 5000 m³ e um outro subterrâneo de 1000 m³, necessitando de mão de obra para o procedimento terrário, e para a montagem do dispositivo. Isto dificulta a possibilidade de análises *in situ*, pois muitas vezes o profissional precisa levar o dispositivo ao campo, utilizando a água do local e realizar os testes de determinação da capacidade natatória em fazendas de criação de peixes, córregos de água, entre outros.

[004] A capacidade natatória é a principal característica para determinação da sobrevivência em muitas espécies de animais aquáticos, inclusive em peixes (PLAUT, *Comp. Biochem. Phys. A*, 131:41-50, 2001). Nos peixes, essa capacidade natatória é subdividida em sustentada, prolongada e explosão. A natação sustentada é aquela que o peixe mantém sua natação por um período, não excedendo 200 min, sem entrar em fadiga. A determinação da natação prolongada é mensurada pelo teste da velocidade crítica de natação (U_{crit}) (SANTOS et al., *Rev. Bras. Rec. Híd.* 12:3, 2007), criado por Brett (*J. Fish Res. Board. Can.* 21:1183:1226, 1964), onde o animal entra em fadiga entre 20 seg. e 200 min. Brett em seu estudo analisou o metabolismo respiratório e o desempenho natatório de uma espécie de salmão (*Oncorhynchus nerka*). O dispositivo utilizado nesse teste, denominado respirômetro de Brett, consistiu de um túnel para natação dos peixes ligado a uma bomba de circulação de água no sistema. Os animais foram colocados nesse túnel, nadando contra a corrente de água em determinada velocidade até atingir a fadiga. Por fim, a natação de explosão envolve

movimentos rápidos de curta duração, sendo inferior a 15-20 seg., (SANTOS et al., *Neotrop. Ichthyol.* 10:4, 2012), com os animais entrando em fadiga por estarem nas velocidades mais altas a qual são capazes de nadar (BEAMISH, *Fish Physiology*, 7, 1978).

[005] A velocidade crítica de natação (U_{crit}) é comumente utilizada para avaliar efeitos de diversos fatores na capacidade de natação dos peixes, como por exemplo, temperatura (BRETT, *J. Fish Res. Board. Can.* 24:1731-1741, 1967; PANG et al., *J. Therm. Biol.* 42: 25-32, 2014), pH (BUTLER et al., *J. exp. Biol.* 165:195-212, 1992), oxigênio (FERREIRA et al., *Acta Amazonica.* 40:699-704, 2010), na tentativa de prever efeitos ecológicos a esses animais em seu habitat natural (PLAUT, *Comp. Biochem. Phys. A*, 131:41-50, 2001). Além desses efeitos, a análise toxicológica de poluentes ganhou destaque no trabalho de Beaumont et al. (*Aquat. Toxicol.* 33:45-63, 1995) ao utilizar U_{crit} como um dos parâmetros na determinação da concentração sub-letal de adultos de truta marrom (*Salmo trutta*) expostos ao cobre, e de Cunningham e Mcgeer (*Aquat. Toxicol.* 173:9-18, 2016) ao analisarem a capacidade de duas espécies de peixes (*Salmo trutta* e *Coregonus clupeaformis*) tinham de executar mergulhos repetitivos após exposição crônica ao cádmio.

[006] Dispositivos adaptados foram construídos a partir do respirômetro de Brett (*J. Fish Res. Board. Can.* 21:1183:1226, 1964) para determinar a capacidade natatória de diversas espécies de peixes, e são apresentados em algumas patentes e artigos científicos descritos a seguir:

[007] A patente CN 104430076 A (2014) descreve uma metodologia de determinação de capacidade natatória sustentada em peixes utilizando um dispositivo. Este disposto compreende um tanque, no qual está inserido um sistema de tubulação circular com uma área demarcada onde permanece o animal e uma bomba com hélice que gera a correnteza necessária para o teste. O documento difere da presente invenção por não apresentar, registro de controle de vazão, reservatório para coleta de amostras, sistema arduíno de monitoramento de velocidade em tempo real e não ser portátil. O que aumenta o espaço necessário para a acomodação do dispositivo e dificulta análises *in situ*.

[008] A patente CN 104026049 A (2014) descreve um dispositivo de observação do comportamento de natação de peixes incluindo um sistema computadorizado. O dispositivo possui tubulações, bombas, inversor de água, tanque tampão, separador sólido líquido, biofiltro, sistema de monitoramento de oxigênio dissolvido, câmeras para monitoramento

do animal sem interferência humana. O fato do dispositivo possuir um sistema de tratamento de água impossibilita que o mesmo seja utilizado para a determinação da capacidade natatória em testes toxicológicos, pois o contaminante adicionado à água seria purificado pelo sistema. Ainda, não se apresenta como um dispositivo portátil o que limita a utilização *in situ*.

[009] A patente CN 105494176 A (2014) revela um dispositivo usado para a determinação da capacidade natatória de peixes compreendendo um tanque exterior com um reservatório interno menor com uma entrada de água na parte inferior, que está ligado a uma bomba de circulação localizada embaixo do dispositivo. O tanque para natação situa-se acima do reservatório de circulação de água estando ligado em suas extremidades por uma barra firmada a um suporte, e é dividido em duas regiões: a primeira região se comunica com o reservatório exterior através de um controlador de fluxo que é formado por uma placa transversal provida de pelo menos três placas verticais ligados a uma válvula de controle de fluxo, a segunda região se comunica com o reservatório exterior através da primeira região. O documento difere da presente invenção por não apresentar um sistema arduíno de monitoramento de velocidade em tempo real, telas de proteção para evitar que o animal se machuque, e ser um dispositivo aberto favorecendo a fuga. Ainda, é um dispositivo não portátil, requerendo dois grandes reservatórios de água para sua operação, o que aumenta o gasto de água.

[010] A patente CN 202857557 U (2013) revela um dispositivo usado para a determinação da capacidade natatória de peixes consistindo de uma sonda indutiva de velocidade posicionada na superfície do corpo do animal, um receptor de indução de velocidade disposto sobre o tanque da água que manda sinais de impulso, através de um cabo de fibra óptica, para um computador que converte os sinais em dados. Este dispositivo determina a capacidade natatória por um método invasivo que pode induzir estresse no animal, podendo interferir nos resultados obtidos. O documento difere da presente invenção por não apresentar um sistema preciso para valores de velocidade de fluxo de água. E ainda, por não ser portátil necessitando estar ligado a um computador, o que limita a utilização *in situ*.

[011] A patente CN 202979896 U (2012) descreve um dispositivo usado para a determinação da capacidade natatória de peixes consistindo de um túnel de natação onde

os peixes nadam contra a correnteza, ligado à bomba de circulação de água por um tubo de entrada de água. O tubo de saída de água dá continuidade a um tubo de retorno à bomba de circulação, ligada a um inversor que controla a velocidade de fluxo da água. Há ainda uma válvula de drenagem no tubo de retorno, que quando aberta sussa a circulação da água. O documento difere da presente invenção por não apresentar um reservatório de água separado que possibilita o controle e monitoramento de fatores físico-químicos da água, não ser portátil, e ainda por não ter telas de proteção para evitar que o peixe se machuque ou que saia fora do túnel destinado ao teste quando levado pela correnteza.

[012] A patente CN 2850270 Y (2005) apresenta um dispositivo de determinação da capacidade natatória em peixes compreendendo um tanque inferior com bomba e tubulação que leva água para um tanque superior. O referido tanque superior possui um sistema de escoamento para evitar que a água transborde. A água desce por uma tubulação para um sistema de válvulas que levam a água para uma piscina que contém uma tubulação onde o peixe estará inserido. Da piscina, sai uma nova tubulação que leva para uma válvula com sistema de coleta de amostra e retorno para o tanque inferior. O dispositivo difere da presente invenção, por não ter sistema arduíno de monitoramento de velocidade em tempo real e não ser portátil. Ainda, devido a trabalhar com altos volumes de água, dificulta o controle da temperatura ou testes em temperaturas mais altas ou mais baixas.

[013] Santos et al. (*Rev. Bras. Rec. Híd.* 12:144-149, 2007) construíram dois respirômetros no Centro de Pesquisas Hidráulicas da UFMG, um com diâmetro nominal de 150 mm utilizado para testes com espécies de até 30 cm de comprimento total, e outro com diâmetro de 250 mm para testes com peixes de até 50 cm. Ambos equipamentos são túneis hidrodinâmicos e o escoamento da água é dado por duas bombas centrífugas que retiram água dos reservatórios, que no primeiro equipamento tem capacidade de 5000 litros e no segundo de 1000 litros por ser subterrâneo. Sampaio (*Dissertação de Mestrado*, UFLA, 2009) apresenta um aparato hidráulico composto por um túnel hidrodinâmico, tubos de PVC de 100 mm de diâmetro e tubo de acrílico de 90 mm de diâmetro e 1 m de comprimento (trecho destinado para o teste), um registro para controle da retenção de água no interior do aparato, um inversor de frequência para regular a rotação da bomba e em consequência a vazão também é regulada, um medidor de vazão entre os tubos PVC, e uma bomba centrífuga que força a água a circular na tubulação. Teve como modelo animal peixes

hipógeos e epígeos, das famílias Trichomycteridae e Charadae, para comparar as capacidades natatórias de peixes ecomorfologicamente semelhantes, mas que vivem em diferentes sistemas hídricos. Os documentos diferem da presente invenção por não apresentarem reservatório para coleta de amostras de água, sistema arduíno de monitoramento da velocidade em tempo real e não serem portáteis, visto que as dimensões citadas requerem um grande espaço para a acomodação dos dispositivos, dificultando análises *in situ*.

[014] De acordo com o descrito no estado da técnica, foi observado que os ensinamentos descritos na presente invenção não foram antecipados de forma que o dispositivo aqui proposto é novo frente ao estado da técnica.

Descrição da Invenção

[015] O dispositivo revelado na presente invenção compreende um túnel de natação para animais aquáticos, acoplado a tubulações que estão ligadas a um sistema arduíno de monitoramento de velocidade em tempo real, uma bomba, um registro para controle de vazão e um reservatório com abertura e tampa removível. Pode ser utilizado para a determinação da capacidade natatória em peixes ou girinos em diferentes condições de laboratório e campo (*in situ*), por ser portátil. Ainda, devido a sua maior mobilidade, pelo tamanho reduzido, e de fácil operacionalização, o que facilita seu uso em aulas práticas e pequenos laboratórios.

[016] A presente invenção propõe um dispositivo para a determinação da capacidade natatória em animais aquáticos onde estes animais nadam contra uma correnteza definida por velocidades de fluxo de água ajustável pelo registro com informações fornecidas em tempo real por um *display* acoplado a um sistema arduíno.

[017] A invenção pode ser entendida pela descrição detalhada acompanhada das figuras anexadas, sendo:

[018] A figura 1 representa o dispositivo com vista frontal, composto por um tubo alongado transparente (1) para visualização do animal no momento do teste, com entrada (2) e saída de água (3), uma abertura na parte superior (4) com tampa (5) para entrada do animal no sistema, tela de proteção (6) no início e final do tubo para evitar ferimentos no

animal em casos de arrastamento pela correnteza, bomba (7), registro (8) para controlar a vazão da água, sensor medidor de fluxo de água (9), ligado por uma fiação elétrica (11), a um sistema arduíno de monitoramento de velocidade em tempo real (10), disposto na extremidade de saída de água (3), conectado por tubulações (13), a um reservatório de água (14) com tampa (15) onde podem ser controlados e monitorados os parâmetros físico-químicos da água, base de sustentação (16), haste de sustentação (17), alça de sustentação (18) para levar o dispositivo na mão.

[019] A figura 2 representa a lateral do equipamento com o tubo alongado transparente (1) suspenso pelas hastes de sustentação (17) e acomodado na base de sustentação (16).

[020] A figura 3 representa o sensor medidor de fluxo (9) de água ligado por uma fiação elétrica (11), a um sistema arduíno com de monitoramento de velocidade em tempo real (10) e *display* (12).

[021] O tubo alongado transparente (1) pode ser de diferentes formatos, comprimentos e diâmetros, a depender do tamanho da espécie a ser utilizada em cada teste. Porém é ideal que seja transparente para a visualização do animal durante todo o teste, pois para determinação da capacidade natatória, o teste é finalizado quando o animal entra em fadiga, sendo este um comportamento de fácil visualização, pois o animal é arrastado pela correnteza. Este tudo alongado (1) também possui entrada (2) e saída de água (3), uma abertura na parte superior (4) com tampa (5) para entrada do animal no sistema. Esta entrada pode ser uma tampa do tipo rosqueável ou de pressão, mas deve ser compatível com a pressão que será utilizada no sistema. Ainda o tubo alongado (1) possui tela de proteção (6) no início e final para evitar ferimentos no animal em casos de arrastamento pela correnteza quando o mesmo entrar em fadiga. Esta tela de proteção (6) deve ser de uma malha resistente e com aberturas pequenas para que o animal não consiga escapar do túnel destinado ao teste.

[022] A bomba (7) de água deve ter uma potência capaz de gerar uma correnteza que leve o peixe a fadiga, o que depende do comprimento e diâmetro do túnel de natação e da resistência física da espécie a ser utilizada. O tamanho da bomba (7) de água junto com o comprimento e largura do tubo alongado transparente (1) pode reduzir a portabilidade do equipamento, pois irá aumentar seu peso total. Preferencialmente, podem ser utilizadas

bombas de água com vazão de 400 a 1600 L/h. Pode também ser submersa para reduzir seu aquecimento, neste caso a bomba pode ser situada dentro do reservatório (14) ou não-submersa, sendo resfriada pela própria corrente interna de água.

[023] O registro (8) para controlar a vazão da água, pode ser de materiais leves, preferencialmente plástico como policloreto de vinila (PVC), porém resistente para suportar grandes pressões devido as maiores vazões de água. Ainda, preferencialmente, conter informações sobre sua abertura ou fechamento e indicador de aumento de vazão de água.

[024] O sensor medidor de fluxo de água (9) do tipo efeito Hall, que mede a quantidade de água que passa no túnel de natação, é compreendido por um pequeno gerador que aproveita a pressão de água gerada pela passagem da água ao se ligar ao dispositivo. A água corrente aciona um rotor localizado no interior do sensor, que está associado a um alternador que produz a energia necessária para a emissão de pulsos a cada rotação do rotor. Preferencialmente impermeável, à prova de explosão, e resistente a calor e frio.

[025] O sistema arduíno de monitoramento de velocidade em tempo real (10) com *display* (12) é formado por uma plataforma de prototipagem eletrônica de hardware livre do tipo arduíno, associada a uma *protoboard* que está ligado a um *display* (12) do tipo LCD. Este sistema recebe a informação emitida pelo sensor medidor de fluxo de água (9) do tipo efeito Hall, processa, e informa a velocidade de fluxo de água que pode ser, preferencialmente, em mL/min ou L/h.

[026] O reservatório de água (14) com tampa (15) preferencialmente de material leve e resistente, com tampa rosqueável ou de pressão afim de suportar pressões exercidas pela velocidade da água circulante no sistema. Na abertura com tampa (15) é possível adicionar equipamentos para a mensuração dos parâmetros físico-químicos da água como, por exemplo, termômetro, pHmetro (pH) e medidor de oxigênio dissolvido (OD) portátil. Também é possível adicionar equipamentos que controlem os parâmetros físico-químicos da água como termostato e bomba anexa de aeração. Nesta mesma abertura com tampa (15) também é possível a coleta de amostras de água para análise laboratorial.

[027] A base de sustentação (16), a haste de sustentação (17) e alça de sustentação (18) servem como suporte para o dispositivo melhorando a sua ergonomia e sua

portabilidade para levar o dispositivo na mão. Preferencialmente construídas com materiais leves e resistentes como alumínio ou plástico rígido como o policloreto de vinila (PVC). A portabilidade deste dispositivo é proporcional ao tamanho final e principalmente o material e peso da base (16), haste (17) e alça (18).

[028] As tubulações (13) podem ser de diâmetro e comprimento variáveis e de materiais compatíveis com a pressão que será utilizada no sistema, preferencialmente de silicone, para baixas pressões e canos de policloreto de vinila (PVC) para altas pressões.

Exemplo 1: Determinação da capacidade natatória em *Danio rerio* (Paulistinha)

[029] A presente invenção foi utilizada para determinar a capacidade natatória de *Danio rerio* em laboratório. Os protocolos utilizados nesse teste foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), processo n. 014/2016. Foram utilizados machos adultos de *Danio rerio* com peso de $0,456 \pm 0,085$ g e comprimento de $3,71 \pm 0,06$ mm. A vazão constante de 0,45 e 0,60 m³/h foram usadas como padrão para criar uma correnteza, submetendo os animais a atividade física. Temperatura, pH e oxigênio dissolvido também foram monitorados durante todo o experimento para assegurar o bem-estar dos animais. A temperatura foi mantida em 25 °C, pH em 6,8 e oxigênio dissolvido em $7,30 \pm 0,22$. As vazões utilizadas no teste (0,45 e 0,60 m³/h) foram consideradas insuficientes para permitir que o *Danio rerio* entrasse em fadiga no intervalo de 200 min. Portanto, considerou-se que os animais estavam em natação sustentada (Santos et al., *Rev. Bras. Rec. Híd.* 12:3, 2007) em baixa velocidade, sendo mantida por metabolismo aeróbico que foi o objetivo do referido teste. O dispositivo construído e as condições laboratoriais se mostraram adequados para a determinação da capacidade natatória sustentada podendo ser utilizado em aulas práticas de fisiologia e testes toxicológicos.

REIVINDICAÇÕES

1. “DISPOSITIVO PORTÁTIL TIPO TÚNEL DE NATAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE NATATÓRIA EM ANIMAIS AQUÁTICOS” caracterizado por compreender um tubo alongado transparente (1) com entrada (2) e saída de água (3), uma abertura na parte superior (4) com tampa (5) para entrada do animal no sistema, tela de proteção (6) no início e final do tubo para evitar ferimentos no animal em casos de arrastamento pela correnteza, conectado a uma bomba (7), registro (8) para controlar a vazão da água, sensor medidor de fluxo de água (9), ligado por uma fiação elétrica (11) a um sistema arduíno de monitoramento de velocidade em tempo real (10), conectado por tubulações (13), a um reservatório de água (14) com tampa (15) onde podem ser controlados e monitorados os parâmetros físico-químicos da água, base de sustentação (16), haste de sustentação (17), alça de sustentação (18) para tornar o dispositivo portátil.
2. “DISPOSITIVO PORTÁTIL TIPO TÚNEL DE NATAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE NATATÓRIA EM ANIMAIS AQUÁTICOS” de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo sistema arduíno de monitoramento de velocidade em tempo real (10) estar acoplado a um *display* (12) e uma *protoboard* fornecendo valores de velocidade de fluxo da água corrente no sistema fornecido pelo sensor medidor de fluxo de água (9) do tipo efeito Hall.
3. “DISPOSITIVO PORTÁTIL TIPO TÚNEL DE NATAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE NATATÓRIA EM ANIMAIS AQUÁTICOS” de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por apresentar alça de sustentação (17) para levar o dispositivo na mão para o campo ou laboratório melhorando sua ergonomia.

RESUMO

“DISPOSITIVO PORTÁTIL TIPO TÚNEL DE NATAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE NATATÓRIA EM ANIMAIS AQUÁTICOS”. A presente invenção trata de um dispositivo para determinação da capacidade natatória em animais aquáticos com uso em laboratórios de pesquisa e ensino e no campo (*in situ*). É um dispositivo do tipo túnel de natação compreendendo um tubo alongado transparente (1) para que o animal seja visualizado, apresentando próximo as extremidades de entrada (2) e saída de água (3) uma tela de proteção (6) para evitar ferimentos no animal em casos de arrastamento pela correnteza, ligado a uma bomba (7) com potência capaz de gerar uma correnteza que leve o peixe a fadiga, e que circula água através de tubulações (12). Um registro (8) para controlar a vazão da água é disposto entre a bomba (7) e um reservatório de água (14) com tampa (15) rosqueável que permite controlar e monitorar parâmetros físico-químicos da água. Um sensor de medição de fluxo de água (9) do tipo efeito Hall mede a quantidade de água que passa no túnel de natação disposto na extremidade de saída de água (3) liga-se por uma fiação elétrica (11) a um sistema arduíno de monitoramento de velocidade em tempo real (10) com display (12) que revela os valores de velocidade de fluxo da água corrente. O dispositivo é apoiado em uma base de sustentação (16) e o tubo alongado transparente (1) é suspenso por haste de sustentação (17), havendo ainda uma alça de sustentação (18) que permite portabilidade do dispositivo, podendo ser carregado na mão para diferentes ambientes.

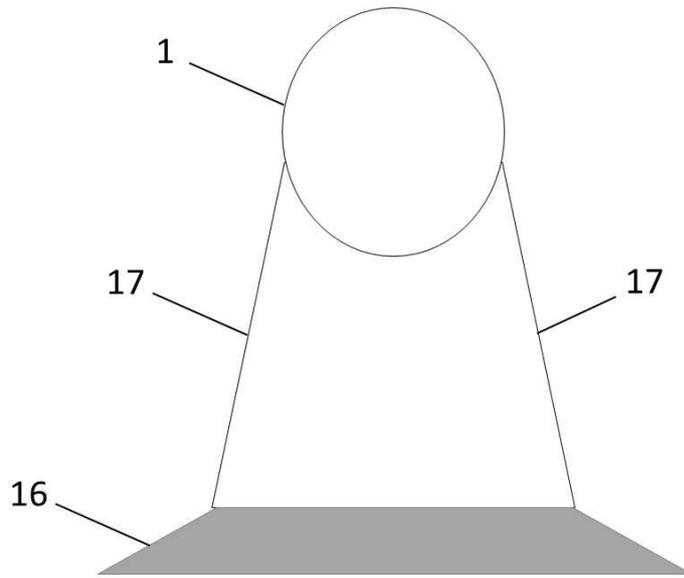


Figura 2

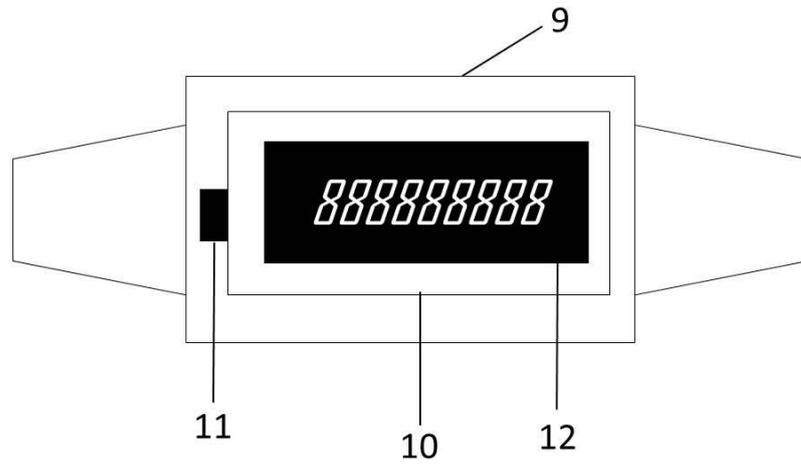


Figura 3

5. Conclusões

O presente trabalho teve o objetivo de avaliar os efeitos da tiroxina livre, complexada à ciclodextrina e levotiroxina nos parâmetros fisiológicos e comportamentais de tambaqui (*Colossoma macropomum*) e ainda avaliar se a complexação com a ciclodextrina torna a T₄ mais tóxica em relação aos parâmetros biológicos analisados, diante disso podemos concluir que:

- Foi possível o desenvolvimento de um complexo de inclusão β -CD-T₄ e sua aplicação em testes de toxicidade;
- O complexo de inclusão β -CD-T₄ em concentração mais elevada (60 ng/L - ANT) foi mais tóxico levando à redução do peso e comprimento dos animais expostos;
- A concentração de 20 ng/L do complexo β -CD-T₄ (AT) provocou um aumento do peso corporal dos peixes;
- *C. macropomum* exibiram comportamentos menos ativos quando expostos à concentração de 60 ng/L tanto do complexo β -CD-T₄ (ANT) quanto da forma sintética de T₄ (L- T₄);
- Em concentrações menores do complexo β -CD-T₄ (AT), *C. macropomum* exibiu maior número de eventos relacionados aos comportamentos agressivos;
- De acordo com os resultados obtidos nos testes de toxicidade crônica, não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) para a taxa metabólica nos peixes expostos ao hormônio e suas derivações;
- O consumo de oxigênio ao longo do tempo foi reduzido ($p < 0,05$) nos grupos expostos aos complexos β -CD-T₄ (40 e 60 ng/L);
- Os resultados do ERG fotópico indicaram que a L-T₄ e o complexo β -CD-T₄ (60 ng/L) promoveram alterações eletrofisiológicas na retina de *C. macropomum*. Entretanto, não foram observadas alterações nos peixes submetidos no eletrorretinograma *flicker*;
- O complexo β -CD-T₄ se mostrou mais tóxico comparado a T₄ livre em relação aos parâmetros analisados;
- A concentração de 20 ng/L para tiroxina, descrita na literatura como encontrada em água tratada (AT), se mostrou pouco tóxica em relação aos parâmetros analisados;

- O protótipo do dispositivo construído se mostrou adequado para a determinação da capacidade natatória, podendo ser utilizado em aulas práticas de fisiologia e testes toxicológicos com animais aquáticos;

6. Anexos

Anexo 1 – Licença da Comissão de Ética no Uso de Animais para a realização dos experimentos desta dissertação.



Universidade Federal Rural de Pernambuco
Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n,
Dois Irmãos - CEP: 52171-900 - Recife/PE

Comissão de ética no uso de animais - CEUA

Licença para o uso de animais em experimentação e/ou ensino

O Comitê de ética no uso de animais CEUA da Universidade Federal Rural de Pernambuco, no uso de suas atribuições, autoriza a execução do projeto discriminado abaixo. O presente projeto também se encontra de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11794/2008.

Número da licença	096/2014
Número do processo	23082.014889/2014
Data de emissão da licença	11 de agosto de 2014
Título do Projeto	Desenvolvimento de complexos de inclusão entre ciclodextrinas e hormônios: Estudos de biodisponibilidade e toxicidade- Parte 4: Análise toxicológica dos efeitos do complexo de inclusão ciclodextrina-tiroxina nos parâmetros fisiológicos e comportamentais do peixe tambaqui (<i>colossoma macropomum</i>).
Finalidade (Ensino, Pesquisa, Extensão)	Pesquisa
Responsável pela execução do projeto	Pabyton Gonçalves Cadena
Colaboradores	Thamiris Pinheiro Santos; Lucas Spicollis Leão de Lima; Stephannie Caroline Barros Lucas da Silva; Marília Cordeiro Galvão da Silva.
Tipo de animal e quantidade total autorizada	Peixe total de 50 animais

Prof. Dr. Marleyne José Afonso Accioly Lins Amorim
 (Presidente em Exercício da CEUA-UFRPE)

 Prof. Dr. Marleyne Amorim
 Coordenadora CEUA

Anexo 2 – Licença da Comissão de Ética no Uso de Animais para a realização de testes do protótipo da patente.



Universidade Federal Rural de Pernambuco

Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n,
Dois Irmãos - CEP: 52171-900 - Recife/PE

Comissão de ética no uso de animais - CEUA

Licença para o uso de animais em experimentação e/ou ensino

O Comitê de ética no uso de animais CEUA da Universidade Federal Rural de Pernambuco, no uso de suas atribuições, autoriza a execução do projeto discriminado abaixo. O presente projeto também se encontra de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11794/2008.

Número da licença	014/2016
Número do processo	23082.023593/2015
Data de emissão da licença	15 de Fevereiro de 2016
Título do Projeto	Nanotoxicologia:Desenvolvimento e efeitos de sistemas de liberação controlada de fármacos a base de alginato, em escala nanométrica, nos parâmetros biológicos e comportamentais de peixes e gastrópodes – Parte 3: Efeitos tóxicos do sistema de liberação controlada em escala nanométrica contendo estradiol sobre o comportamento e fisiologia de <i>Danio rerio</i> .
Finalidade (Ensino, Pesquisa, Extensão)	Pesquisa
Responsável pela execução do projeto	Pabyton Gonçalves Cadena
Colaboradores	Amanda Rodrigues dos Santos; Thamiris Pinheiro Santos; Marília Cordeiro Galvão da Silva ; Jadson Freitas da Silva; Ericka Queiroz de Souza.
Tipo de animal e quantidade total autorizada	Peixe ; (<i>Danio rerio</i>)- Teste de toxicidade 30; (<i>Danio rerio</i>) – Desenvolvimento do plano anestésico 30; (<i>Danio rerio</i>)- Indução de reprodução 30; total 90 animais.(60 machos e 30 fêmeas).

Prof^a. Dra. Marleyne José Afonso Accioly Lins Amorim
(Coordenadora da CEUA-UFRPE)

Prof^a Dr. Marleyne Amorim
Coordenadora CEUA

Anexo 3 – Etograma comportamental de *Colossoma macropomum* modificado de Soares et al. (2016).

Categoria	Comportamento	Abreviatura	Descrição
Locomoção	Nadar Lento	NL	Deslocamento lento na vertical ou horizontal.
	Nadar Rápido	NR	Deslocamento rápido na vertical ou horizontal.
	Nadar Junto	NJ	Deslocamento dirigido de vários animais (cardume) de forma lenta ou rápida.
	Emergir e Submergir	ES	Emergir a superfície da água, realizar rápida respiração aérea e submergir logo em seguida.
	Permanecer Parado	PP	Não apresentar deslocamento por, no mínimo, 5 seg.
Social Agonístico	Perseguir	PR	Natação rápida em direção ao oponente, fazendo ou não contato físico.
	Fugir	FR	Se afastar do oponente que o persegue ou ataca.
	Ataque Frontal	AF	Ataque mútuo com a boca entre peixes posicionados frente à frente.
	Ataque Lateral	AL	Ataque com a boca na lateral do corpo do oponente.
Manutenção	Comer	CO	Engolir o alimento.
	Forragear	FO	Procura ativa por alimento.
Comportamentos Associados ao Estresse	Respiração Aérea	RA	Respiração aérea por, no mínimo, 5 seg.
	Saltar	SA	Saltar sobre a lâmina de água.
	Natação Errática	NE	Deslocamento em espiral.
	Imóvel	IM	Imobilidade no fundo do aquário por, no mínimo, 5 seg. com um dos lados do corpo sobre o fundo do aquário.

	Natação Superficial	NS	Deslocamento próximo a lâmina da água.
	Coprofagia	CP	Alimentar-se de fezes no substrato.
	Permanecer verticalmente na superfície	PVS	Postura vertical próximo à lâmina d'água por, no mínimo, 5 seg.
	Compulsão alimentar	CA	Ato de se alimentar sem a presença de alimento.

Anexo 4 – Trabalhos publicados.

ANDRADE, A. L. C.; SOARES, P. R. L.; SILVA, S. C. B. L.; SILVA, M. C. G.; SANTOS, T. P.; CADENA, M. R. S.; SOARES, P. C.; CADENA, P. G. Evaluation of the toxic effect of endocrine disruptor Bisphenol A (BPA) in the acute and chronic toxicity tests with *Pomacea lineata* gastropod. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, v. 197, p. 1-7, 2017.

SILVA, M. C. G. et al. Avaliação do impacto causado pela disponibilidade de 17 β -estradiol livre ou complexado à β -ciclodextrina no ambiente aquático sobre *Oreochromis niloticus* (tilápia). *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, Article in Press, 2017.

SANTOS, B.D.; SILVA, M. C. G.; SANTOS, T.P.; SILVA, S.C.B.L.; CADENA, M.R.S.; CADENA, P. G. Efeitos de hormônios esteroides de contraceptivos orais combinados sobre os parâmetros comportamentais de *Betta splendens* (Regan, 1909). *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (Online)*, v. 68, p. 387-396, 2016.

SOARES, P. R. L.; ANDRADE, A. L. C.; SANTOS, T. P.; SILVA, S. C. B. L.; SILVA, J. F.; SANTOS, A. R.; SOUZA, E. H. L. S.; CUNHA, F. M.; TEIXEIRA, V. W.; CADENA, M. R. S.; SÁ, F. B.; JÚNIOR, L. B. C.; CADENA, P. G. Acute and chronic toxicity of the benzoylurea pesticide, lufenuron, in the fish, *Colossoma macropomum*. *Chemosphere (Oxford)*, v.161, p.412-421, 2016.

SANTOS, T. P.; SILVA, M. C. G.; SILVA, S. C. B. L.; CADENA, P. G. Dispositivo portátil tipo túnel de natação para determinação da capacidade natatória em animais aquáticos, 2016. Categoria: Produto. Instituição onde foi depositada: INPI Instituto Nacional da Propriedade Industrial. País: Brasil. Natureza: Patente de Invenção.

Número do registro: BR10201601703. Data de depósito: 22/07/2016.
Depositante/Titular: Universidade Federal Rural de Pernambuco.

SILVA, M. C. G.; SILVA, J. F.; SANTOS, T. P.; SILVA JUNIOR, V. A.; CADENA, P. G. Sistema para reprodução de peixes com coletor de ovos, 2016. Categoria: Produto. Instituição onde foi depositada: INPI Instituto Nacional da Propriedade Industrial. País: Brasil. Natureza: Patente de Modelo de Utilidade. Número do registro: BR20201601704. Data de depósito: 22/07/2016. Depositante/Titular: Universidade Federal Rural de Pernambuco.

SANTOS, T. P.; SILVA, S. C. B. L.; SILVA, M. C. G.; SANTOS, A. R.; CADENA, P. G. Determinação da capacidade natatória de *Danio rerio* em equipamento portátil. In: XXXI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental FeSBE, Foz do Iguaçu. FeSBE 2016.

SILVA, M. C. G.; SILVA, J. F.; SANTOS, T. P.; CADENA, P. G. Progesterona como desregulador endócrino e seu efeito tóxico no desenvolvimento de *Danio rerio*. In: XXXI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental FeSBE, Foz do Iguaçu. FeSBE 2016.

SILVA, S. C. B. L.; ANDRADE, A. L. C.; SOARES, P. R. L.; SANTOS, T. P.; SILVA, M. C. G.; CADENA, P. G. Avaliação do efeito de interferentes endócrinos sob a fisiologia de *Pomacea bridgesi* e sua utilização como organismo teste em ecotoxicologia. In: XV Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão, Recife-PE. JEPEX 2015.

ANDRADE, A. L. C.; SILVA, S. C. B. L.; SOARES, P. R. L.; SILVA, M. C. G.; SANTOS, T. P.; CADENA, P. G. Effect of salinity on heart rate of *Pomacea lineata* neonates as a noninvasive method for animal physiology study In: L Congress of the Brazilian Society of Physiology (SBFis), Águas de Lindóia. SBFis 2015.

SOUZA, E. Q.; OLIVEIRA, E. G. S.; ANDRADE, A. L. C.; SILVA, S. C. B. L.; SANTOS, T. P.; SOARES, P. R. L.; CADENA, M. R. S.; CADENA, P. G. Effects of estradiol and bisphenol as endocrine disruptors on the aggressive behavior of *Betta splendens*. In: L Congress of the Brazilian Society of Physiology (SBFis), Águas de Lindóia. SBFis 2015.

SOARES, P. R. L.; SOUZA, E. H. L. S.; ANDRADE, A. L. C.; SANTOS, T. P.; SILVA, S. C. B. L.; SA, F. B.; CADENA, P. G. Electroretinograms full field by light flashes in

Colossoma macropomum in vivo. In: L Congress of the Brazilian Society of Physiology (SBFis), Águas de Lindóia. SBFis 2015.

SANTOS, T. P.; OLIVEIRA, E. G. S.; SOARES, P. R. L.; SILVA, S. C. B. L.; ANDRADE, A. L. C.; SILVA, M. C. G.; CADENA, M. R. S.; CADENA, P. G. Thyroxine effect as endocrine disruptor in behavior of tambaqui (*Colossoma macropomum*) In: L Congress of the Brazilian Society of Physiology (SBFis), Águas de Lindóia. SBFis 2015.

SILVA, M. C. G.; SILVA, J. F.; OLIVEIRA, D. M. F.; SANTOS, T. P.; GOMES, S. S.; CADENA, P. G. Efeitos tóxicos do 17 β estradiol no desenvolvimento embrionário de *Danio rerio* (zebrafish). In: XIV Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia (ECOTOX 2016). Curitiba. ECOTOX 2016.

SANTOS, T. P.; SILVA, S. C. B. L.; SOARES, P. R. L.; SILVA, M. C. G.; ANDRADE, A. L. C.; CADENA, P. G. Tiroxina como disruptor endócrino e seus efeitos no comportamento e taxa metabólica de *Colossoma macropomum*. In: XIV Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia (ECOTOX 2016). Curitiba. ECOTOX 2016.