

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CAMPUS SÃO CARLOS**

**PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS - UFSCar-UNESP**

NÍCOLAS FERNANDES MARTINS

**EFEITOS DO CONTAMINANTE EMERGENTE TRICLOSAN SOBRE A
FUNÇÃO CARDIORESPIRATÓRIA DO MATRINXÃ, *Brycon
amazonicus*, EM NORMÓXIA E DURANTE HIPÓXIA GRADUAL**

São Carlos

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CAMPUS SÃO CARLOS

PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS - UFSCar-UNESP

NÍCOLAS FERNANDES MARTINS

EFEITOS DO CONTAMINANTE EMERGENTE TRICLOSAN SOBRE A
FUNÇÃO CARDIORESPIRATÓRIA DO MATRINXÃ, *Brycon*
amazonicus, EM NORMÓXIA E DURANTE HIPÓXIA GRADUAL

Tese de Doutorado apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas associação ampla UFSCAR/UNESP, para obtenção do título de Doutor em Ciências, área de concentração em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Lucia Kalinin

Co-orientador: Dr. David J. McKenzie

São Carlos

2018

FOLHA DE APROVAÇÃO

NÍCOLAS FERNANDES MARTINS

EFEITOS DO CONTAMINANTE EMERGENTE TRICLOSAN SOBRE A FUNÇÃO CARDIORESPIRATÓRIA DO MATRINXÃ, *Brycon amazonicus*, EM NORMÓXIA E DURANTE HIPÓXIA GRADUAL.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação, para obtenção do título de Doutor em Ciências, Área de Concentração em Ciências Fisiológicas.

Universidade Federal de São Carlos, 26 de outubro de 2018.

Orientadora:

Dra. Ana Lúcia Kalinin

Departamento de Ciências Fisiológicas/Universidade Federal de São Carlos

Examinadores:

Prof. Dr. Eliton da Silva Vasconcelos

Universidade Estadual de Minas Gerais – UEMG (Passos, MG)

Prof. Dr. Hugo Ribeiro da Silva

Centro Universitário Central Paulista – UNICEP (São Carlos, SP)

Prof. Dr. Luiz Henrique Florindo

Universidade Estadual Paulista - UNESP (São José do Rio Preto, SP)

Profa. Dra. Diana Amaral Monteiro

Universidade Federal de São Carlos - UFSCar (São Carlos, SP)



Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado do candidato Nicolas Fernandes Martins, realizada em 26/10/2018:



Profa. Dra. Ana Lúcia Kalinin
UFSCar



Prof. Dr. Eliton da Silva Vasconcelos
UEMG



Prof. Dr. Hugo Ribeiro da Silva
UNICEP



Profa. Dra. Diana Amaral Monteiro
UFSCar



Prof. Dr. Luiz Henrique Florindo
UNESP

DEDICATÓRIA

Aos brasileiros que acreditam na mudança, um país justo e igualitário. Obrigado a todos os trabalhadores que com seus impostos fomenta a educação, a pesquisa e um país melhor.

“Não poderia deixar de citar o apoio incondicional da grande mentora desse trabalho, que com sua simplicidade e amor me acolheu e deu essa oportunidade maravilhosa: Ana Lúcia Kalinin”.

... essa mulher sensacional que é a minha mãe.



AGRADECIMENTOS

À prof^a Dr^a Ana Lúcia Kalinin pelo apoio e o carinho.

Ao Dr. Nathan Dias Martins que muitas vezes pacientemente deu várias dicas, ouviu e aconselhou incondicionalmente sempre ajudando. A gente não faz amigos, reconhece-os.

Ao Dr. David J. McKenzie por vários ensinamentos das cirurgias, das motangens dos respirometros e dos cálculos utilizando o R, meus sinceros agradecimentos.

À Ms. Carol de Angelis pelo auxílio nas cirurgias e por compartilhar os seus conhecimentos.

Ao Dr. Cléo Alcantara Leite por compartilhar e ajudar com equipamentos, ensinando como usar os softwares e materiais para realização do experimento.

Ao tecnólogo e amigo Gustavo Oda, que muitas vezes ajudou com a parte técnica.

À Dr^a. Diana Amaral Monteiro, pelo auxílio nos cálculos estatísticos e utilização dos equipamentos.

Ao amigo e biólogo Willy Fortes, pelo inestimável auxílio na condução dos experimentos de expressão protéica.

Aos MScs. Felipe Rocco e Vivian Zeraik, pelo convívio compartilhado na respirometria.

À estatística Ana Fernanda Noli pela ajuda em vários momentos do trabalho.

À CAPES, pela concessão da bolsa de doutorado, e ao CNPq pelo suporte financeiro.

A todos que diretamente e indiretamente ajudaram nesse trabalho.

“Não se pode ir longe na amizade sem se estar disposto a perdoar os pequenos defeitos um ao outro. Às vezes, não perdoar nos impede de continuar”.

Jean de la Bruyere

L'amore Verrà (Nina Zilli)

Voglio amare,
però lo so,
non potrò mai mai
cambiare il mondo:
aspetto qui

L'amore verrà
uh l'amore verrà
ogni cosa a suo tempo
prima o poi mi toccherà

L'amore verrà
uh l'amore verrà
lo sentirò subito
lo capirò subito

E come d'incanto guarirò

e tutti i sogni miei
e tutti i giorni miei
e tutti i baci miei
io li regalerò
finalmente a lui
solamente a lui
e così l'aspetto qui

Sì, l'amore verrà
ogni cosa a suo tempo
prima o poi mi toccherà

Lo aspetto perché
so che un giorno verrà
lo sentirò subito
lo capirò subito

E come d'incanto guarirò

e tutti i giorni miei
e tutti i sogni miei
e tutti i baci miei

io li regalerò
finalmente a lui
solamente a lui
e così l'aspetto qui

Sì, l'amore verrà
ogni cosa a suo tempo
prima o poi mi toccherà

L'amore verrà
l'amore verrà
ogni cosa a suo tempo
ed anche lui lo troverà con me

E poi poi
finalmente
fra le braccia sue
potrò restare

L'amore verrà
l'amore verrà
ogni cosa a suo tempo
prima o poi mi toccherà

L'amore verrà
l'amore verrà
lo sentirò subito
lo capirò subito

L'amore verrà
uh, l'amore verrà

A minha singela gratidão à Ana Fernanda Noli

RESUMO

Muitos compostos orgânicos presentes nos corpos d'água, chamados contaminantes emergentes, ainda não são contemplados nas legislações ambientais brasileiras. Tais compostos necessitam ser avaliados por apresentarem elevada toxicidade aos organismos vivos, provocando sérios problemas aos ecossistemas e à saúde animal e humana, entre eles o triclosan (TCS). O crescente uso do TCS pela indústria e numa variedade de produtos domésticos comuns, incluindo detergentes, cremes dentais, sabonetes, entre outros, resulta em lançamento de grandes e crescentes quantidades deste composto nos corpos d'água, podendo afetar a saúde e sobrevivência de organismos aquáticos. A legislação brasileira estabeleceu uma concentração máxima de TCS de 0,3 %, para produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes, mas não há nenhum limite estabelecido para concentrações máximas permitidas nos diferentes corpos d'água. Apesar da preocupação com tal contaminante, poucos são os trabalhos abordando seus efeitos fisiológicos sobre os organismos aquáticos, particularmente os peixes. O presente trabalho avaliou o efeito do TCS sobre a função cardiorrespiratória *in vivo* e sobre a expressão de proteínas cardíacas envolvidas no manejo de cálcio cardíaco do matrinxã, *Brycon amazonicus*. Entre os principais achados, o presente trabalho mostrou que: a) em presença de TCS a água não atinge 100% de saturação com O₂; b) O TCS não apenas reduz a taxa metabólica como também aumenta a tenção crítica de O₂, reduzindo a capacidade de manter a tomada de O₂ constante e, conseqüentemente, reduzindo as chances de sobrevivência em ambientes hipóxicos; c) a necessidade ventilatória é significativamente aumentada pelo TCS, mostrando diminuição significativa da eficiência das brânquias na troca de O₂ além de aumentar o gasto energético para a troca gasosa; d) o TCS teve um efeito depressor na frequência cardíaca e aumentou a expressão de canais de cálcio do tipo L e do trocador Na⁺/Ca²⁺. Em conjunto, os resultados obtidos no presente trabalho mostram que o TCS, mesmo em baixas concentrações e em exposições de curta duração (96h) diminui a capacidade respiratória da espécie e interfere no manejo de cálcio cardíaco. O efeito depressor da função cardio-respiratória *in vivo*, bem como as alterações na expressão de proteínas envolvidas no acoplamento excitação-contração cardíaco de matrinxã reforçam a necessidade não apenas de reavaliação da utilização de TCS em produtos de consumo como também do estabelecimento de limites máximos permitidos em águas para consumo humano e conservação da vida aquática.

Palavras-chave: Triclosan-TCS, Matrinxã-*Brycon amazonicus*, Respostas Cardiorespiratórias e Hipóxia.

ABSTRACT

Many organic compounds present in bodies of water, called emerging contaminants, are not yet contemplated in Brazilian environmental legislation. Such compounds need to be evaluated for their high toxicity to living organisms, causing serious problems for ecosystems, animal and human health. Among these compounds, widely used, is triclosan (TCS). The increasing use of TCS by the industry and a variety of common household products, including detergents, toothpastes, soaps, among others, results in the release of large and increasing amounts of this compound in water bodies, which can affect the health and survival of organisms aquatic. Brazilian legislation has established a maximum TCS concentration of 0.3% for personal care products, cosmetics and perfumes, but there is no established limit for maximum permissible concentrations in the different water bodies. Despite the concern with such contaminant, few works are addressing its physiological effects on aquatic organisms, particularly fish. The present study evaluated the effect of TCS on cardiorespiratory function in vivo and on the expression of cardiac proteins involved in the management of cardiac calcium of *Brycon amazonicus*. Among the main findings, the present study showed that: a) in the presence of TCS the water does not reach 100% saturation with O₂; b) TCS not only reduces the metabolic rate but also increases the critical O₂ uptake, reducing the ability to keep O₂ uptake constant and, consequently, reducing the chances of survival in hypoxic environments; c) the ventilatory requirement is significantly increased by the TCS, showing a significant decrease in the efficiency of the gills in the exchange of O₂ besides increasing the energy expenditure for the gas exchange; d) TCS had a depressant effect on heart rate and increased expression of L-type calcium channels and Na⁺ / Ca²⁺ exchanger. Together, the results obtained in the present study show that the TCS, even in low concentrations and in short exposures (96h), decreases respiratory capacity of the species and interferes in the management of cardiac calcium. The depressant effect of cardio-respiratory function in vivo as well as changes in the expression of proteins involved in the cardiac excitation-contraction coupling of *matrinxã* reinforce the need not only for reassessment of the use of SCC in consumer products but also for the establishment of maximum limits waters for human consumption and conservation of aquatic life.

Keywords: Triclosan-TCS, *Matrinxã-Brycon amazonicus*, cardiorespiratory responses and Hypoxia.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	7
1.1. O Triclosan	9
1.1.1 Ciclo do Triclosan	1
1.1.2. Presença de Triclosan no Ambiente	12
1.1.3. Contaminação da Biota com Triclosan	14
1.2 Demanda Bioquímica de Oxigênio na Água	17
1.3 Função Cardiorespiratória de Peixes	20
1.4 Respirometria de Peixes	24
1.4.1 Respirômetro de Sistema Fechado ou Estático	24
1.4.2 Sistema Aberto ou de Fluxo Constante	25
1.4.3 Sistema fechado de fluxo intermitente	26
1.4.4. Análises da Concentração de Oxigênio na Água	28
1.5. O matrinxã, <i>Brycon amazonicus</i>	29
2. OBJETIVOS	31
3. MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1. Material	32
3.2. Métodos	32
3.2.1. Determinação da taxa metabólica	33
3.2.2. Determinação dos parâmetros cardiorrespiratórios.	34
3.2.3 Fundamentos Matemáticos para Respirometria Fechada de Fluxo Intermitente	37
3.3. Tratamento Estatístico dos Resultados	44
4. RESULTADOS	45
4.1. Respostas cardiorrespiratórias in vivo.	45
4.2. Western Blotting	55
4.2.1. Expressão de Proteínas	56
5. DISCUSSÃO	60
5.1. Respostas Cardiorespiratórias in vivo.	60
5.2. Expressão de Proteínas Cardíacas	68
6. CONCLUSÕES	72
7. REFERÊNCIAS	74

LISTA DE ABREVIATURAS

Ctrl	Controle
Bpm	Batimentos por minuto
TCS	Triclosan
$\dot{M}O_2$	Consumo de Oxigênio (Taxa Metabólica)
\dot{V}_G	Ventilação Branquial
$CO_{2(O)}$	Concentração de O_2 que sai do respirômetro ($mg\ O_2\ L^{-1}$)
V_T	Volume corrente ventilatório
$CO_{2(I)}$	Concentração de O_2 que entra no respirômetro ($mg\ O_2\ L^{-1}$)
F	Fluxo da água através do respirômetro ($L\ min^{-1}$).
O_{crit} ou PcO_2	Tensão Crítica de Oxigênio ou Oxigênio Crítico
S	% O_2 por hora
V_{resp}	Volume do Respirômetro
α_{O_2}	Solubilidade de oxigênio ($mmol/L^{-1}$ ou mg/L^{-1})
$\dot{V}_G/\dot{M}O_2$	Necessidade ventilatória
EO_2	Extração de Oxigênio da Corrente Ventilatória
f_R	Frequência Respiratória
PO_2	Tensão de Oxigênio
f_H	Frequência cardíaca (Batimento por minuto-bpm)
m	Peso fresco do animal
$PinO_2$	$PinO_2$ = Tensão de O_2 (mmHg) da água de entrada
PiO_2	Tensões de O_2 (mmHg) da água de entrada ($PinO_2$ - mmHg) do respirometro

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1: Estrutura molecular do triclosan</i>	9
<i>Figura 2: Ciclo do triclosan no meio ambiente.</i>	11
<i>Figura 3: Balanço de oxigênio dissolvido nos sistemas aquáticos</i>	19
<i>Figura 4: Estrutura branquial de um teleósteo. Destaque para o fluxo contracorrente entre a água e o sangue</i>	22
<i>Figura 5: Representação esquemática do coração de peixes teleósteos</i>	23
<i>Figura 6: Traçado eletrocardiográfico de matrinxã, <i>Brycon amazonicus</i>.</i>	23
<i>Figura 7: Respirometria de Sistema fechado ou estático</i>	25
<i>Figura 8: Respirômetro Aberto ou de Fluxo Constante.</i>	27
<i>Figura 9: Ciclo de medidas (loop) no respirômetro de fluxo intermitente</i>	28
<i>Figura 10: Exemplar de matrinxã, <i>B. amazonicus</i></i>	29
<i>Figura 11: Respirometria Fechada de Fluxo Intermitente</i>	33
<i>Figura 12: Preparação dos peixes para os experimentos</i>	35
<i>Figura 13: Respirômetro fechado de fluxo intermitente</i>	36
<i>Figura 14: Set experimental de respirometria de fluxo fechado intermitente</i>	36
<i>Figura 15: Medidas de concentração de O₂ na água por diferentes técnicas</i>	46
<i>Figura 16: Taxa metabólica ($\dot{M}O_2$) de matrinxã, <i>Brycon amazonicus</i>, controle e expostos ao triclosan durante 96 h</i>	47
<i>Figura 17: Consumo de oxigênio de <i>B. amazonicus</i> do grupo controle em normóxia e hipóxia gradual</i>	48
<i>Figura 18: Efeito da redução gradual das tensões de oxigênio da água de entrada do respirômetro ($PiO_2 - mmHg$)</i>	49
<i>Figura 19: Taxa metabólica ($\dot{M}O_2$) de matrinxã, <i>Brycon amazonicus</i>, em relação às reduções graduais da PiO_2 (mmHg)</i>	49
<i>Figura 20: Ventilação branquial (V_G), frequência respiratória (f_R) e o volume ventilatório (V_T) de <i>B. amazonicus</i> dos grupos controle e exposto ao TCS</i>	52
<i>Figura 21: Necessidade ventilatória ($V_G/\dot{M}O_2$), de <i>Brycon amazonicus</i></i>	53
<i>Figura 22: Frequência cardíaca (f_H) de <i>Brycon amazonicus</i> durante reduções nas tensões de O₂ da água inspirada</i>	55
<i>Figura 23: Membranas ilustrando expressão do Canal cálcio tipo L</i>	57
<i>Figura 24: Níveis de expressão dos Canais de Cálcio L em <i>Brycon amazonicus</i></i>	57
<i>Figura 25: Membranas ilustrando expressão do Trocador NCX</i>	58

LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 1: Categorização de alguns contaminantes emergentes</i>	8
<i>Tabela 2: Propriedades físicas e químicas do triclosan</i>	9
<i>Tabela 3: Concentrações de triclosan encontradas em corpos d'água ao redor do mundo ...</i>	14
<i>Tabela 4: Valores de CL50 96h para o triclosan em diferentes espécies de peixes</i>	15
<i>Tabela 5: Composição do gel de Corrida 10% e Empilhamento com os respectivos volumes .</i>	41
<i>Tabela 6: Valores médios da taxa metabólica ($\dot{M}O_2$) de <i>B. amazonicus</i> dos grupos controle (CTRL - n = 8) e exposto ao triclosan (TCS - n = 8) em normóxia e hipóxia gradual.....</i>	48
<i>Tabela 7: Valores médios de ventilação branquial (V_G), frequência respiratória (fR) e volume ventilatório (VT) de <i>B. amazonicus</i> dos grupos controle (CTRL - n = 8) e exposto ao triclosan (TCS - n = 8) em normóxia e hipóxia gradual.</i>	50
<i>Tabela 8: Valores médios da necessidade ventilatória -$V_G/\dot{M}O_2$ (L.mmol⁻¹) de <i>B. amazonicus</i> dos grupos controle (CTRL - n = 8) e exposto ao triclosan (TCS - n = 8) em normóxia e hipóxia gradual.</i>	53
<i>Tabela 9: Valores médios de frequência cardíaca (fH) de <i>B. amazonicus</i> dos grupos controle (CTRL - n = 8) e exposto ao triclosan (TCS - n = 8) em normóxia e hipóxia gradual.....</i>	54
<i>Tabela 10: Valores dos parâmetros morfológicos dos grupos controle e exposto ao triclosan</i>	56

1. INTRODUÇÃO

A água é o componente essencial para a vida e representa o principal constituinte de todos os seres vivos, sendo que, seus múltiplos usos são indispensáveis a um largo espectro das atividades humanas, destacando-se, entre outras, o abastecimento público e industrial, a irrigação agrícola, a produção de energia elétrica e as atividades de lazer e recreação, bem como a preservação da vida aquática.

Nas últimas décadas, no entanto, os ecossistemas aquáticos têm sofrido alterações significativas em função de diversos fatores antropogênicos tais como mineração, urbanização, construção de represas e barragens, interferência no curso natural dos rios, desmatamento e uso inadequado do solo, intensa atividade agrícola e lançamentos de efluentes domésticos e industriais.

De particular interesse são os contaminantes ou poluentes emergentes, substâncias potencialmente tóxicas cujos efeitos ou presença no ambiente são ainda pouco conhecidos. Tais substâncias englobam tanto aquelas que já vêm sendo utilizadas há tempo, como também novas substâncias decorrentes dos avanços tecnológicos (BARCELÓ, 2003). A tabela 1 apresenta alguns dos principais contaminantes emergentes, divididos por categorias. O termo “emergente” se refere à preocupação que estas substâncias têm trazido à luz de novos conhecimentos adquiridos sobre seus impactos reais e potenciais à saúde humana e ambiental. Os contaminantes emergentes não estão incluídos em programas de monitoramento de rotina pelos órgãos de meio ambiente, na saúde e tampouco estão inseridos em normas ou legislações de controle ambiental.

O triclosan (TCS), um composto que tem sido amplamente utilizado como agente antimicrobiano, está entre os contaminantes emergentes amplamente utilizados. O TCS apresenta uma ampla gama de atividades contra bactérias gram-negativas e gram-positivas, fungos e leveduras. Devido às suas propriedades desinfetantes, o triclosan vem sendo utilizado por muitos anos em uma variedade de produtos de higiene pessoal como xampus, sabonetes, cremes dentais, cosméticos, produtos de limpeza doméstica, em têxteis e plásticos utilizados em roupas esportivas, calçados, tapetes e utensílios culinários (LEVY et al., 1999). Após os diversos meios de utilização, o triclosan chega a corpos hídricos por meio de lançamento de efluentes de Estações de Tratamento de Esgoto (ETE), podendo afetar a saúde e sobrevivência de organismos aquáticos. Apesar da preocupação com tal contaminante emergente, poucos são

os trabalhos abordando seus efeitos fisiológicos sobre os organismos aquáticos, particularmente os peixes.

TABELA 1: Categorização de alguns contaminantes emergentes

CLASSE DE SUBSTÂNCIA	EXEMPLOS
Fármacos	
Antibióticos	Trimetropim, eritromicina, lincomicina, sulfametazona
Analgésicos e drogas anti-inflamatórias	Codeína, ibuprofeno, acetaminofeno, ácido acetilsalicílico, diclofenaco, fenoprofeno
Drogas psiquiátricas	Diazepan
Reguladores lipídicos	Bezafibrato, ácido clofíbrico, ácido fenofíbrico
β -bloqueadores	Metoprolol, propranolol, timolol
Contrastes (raio X)	Iopromide, iopamidol, diatrizoate
Esteróides e hormônios (contraceptivos)	Estradiol, estrona, estriol, dietilestilbestrol
Produtos de uso pessoal	
Fragrâncias	Nitropolicíclicos e macrocíclicos
Agentes de proteção solar	Benzofenona, cânfora, metilbenzilideno
Repelentes	N.N-dietiltoluamida
Antissépticos	Triclosan , clorofeno
Surfactantes	Alquifenol etoxilados, alquifenóis (nonifenol e octilfenol), alquifenóis carboxilados
Retardantes de chama	Difenil éteres polibromados (PBDEs), tetrabromo bisfenol A, Tris(2-cloroetil)fosfato
Agentes e aditivos industriais	Agentes quelantes (EDTA), sulfonados aromáticos
Aditivos de gasolina	Dialquiléteres, metil-t-butil éter (MTBE)
Produtos de desinfecção	Iodo-THMs, bromoácidos, bromoacetnitrilas, bromaldeídos, cianoformaldeídos, bromatos, NDMA
Nanomateriais	Cosméticos, protetores solares, biosensores, etc.

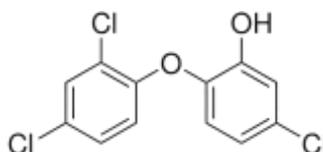
(adaptada de BARCELÓ, 2003)

1.1. O Triclosan

O triclosan (TCS), cuja denominação química é 5-cloro-2-(2,4-diclorofenoxi)fenol, é um composto fenólico (fig. 1) que se apresenta como um pó cristalino, sendo conhecido comercialmente como Irgasan DP-300, Lexol 300, Ster-Zac, Cloxifenolum, BioFresh e Microban (FANG et al., 2010) . O TCS possui massa molecular de $289,54 \text{ g.mol}^{-1}$, é pouco solúvel em água (12 mg.L^{-1} a $20 \text{ }^\circ\text{C}$), exceto em pH alcalino, e possui elevada solubilidade na maioria dos solventes orgânicos (FANG et al., 2010).

Apresenta estabilidade térmica elevada, o que permite sua incorporação em vários materiais plásticos (ORVOS et al., 2002), sendo um composto não ionizável em pH neutro ($\text{pK}_a= 8,1$), Possui um coeficiente de partição octanol-água relativamente alto ($\log \text{Kow}$ de 5,4), o que sugere que na forma protonada esse composto possa ser solúvel em ambientes aquáticos (SINGER et al., 2002). Suas propriedades físicas e químicas são apresentadas na tabela 2.

Figura 1: Estrutura molecular do triclosan



(FANG et al., 2010)

TABELA 2: Propriedades físicas e químicas do triclosan

Fórmula Molecular	$\text{C}_{12}\text{H}_7\text{Cl}_3\text{O}_2$
Peso Molecular	$289,5 \text{ g/mol}$
Cor	Cristais Brancos
Gravidade Específica	$1,55 \times 10 \text{ Kg/m}$ a 22°C
Estabilidade	Estável em condições Normais
Ponto de Fusão	$56,5^\circ\text{C}$
Solubilidade em Água	$0,012 \text{ g/L}$ a 20°C
Constante de partição (LogKnow)	$4,8$ a 25°C
Pressão de Vapor	$2,2\text{E}-6 \text{ mm Hg}$ a 20°C

(adaptada de FANG et al., 2010)

Devido às suas múltiplas aplicações, o TCS tem sido identificado em águas residuais e superficiais, bem como em outras matrizes ambientais. Este composto apresenta baixa toxicidade e é parcialmente removido durante os tratamentos de águas residuais convencionais. No entanto, este composto passou a chamar atenção devido à sua semelhança estrutural química com contaminantes altamente tóxicos e persistentes, como as dioxinas, e também devido à possibilidade de sua conversão nestes compostos perigosos. Assim, o destino ambiental do TCS é um assunto de preocupação especial (SANCHEZ-PRADO et al., 2006).

De acordo com AHN et al. (2008), embora amplamente classificado como hidrocarboneto aromático halogenado, o TCS possui representativos funcionais de fenóis, éteres difenílicos e bifenilos policlorados (PCBs). A atividade de TCS nos músculos (que será discutida adiante), segundo esses autores, pode refletir sua capacidade de assumir uma conformação como a dos PCBs não-polinucleares.

No ambiente aquático, vários são os fatores que influenciam a fotodegradação do TCS, tais como: pH, irradiação solar, quantidade de matéria orgânica dissolvida, presença de co-solutos, íons metalatos e de metabólitos (SUAREZ et al., 2007; SANCHEZ-PRADO et al., 2006).

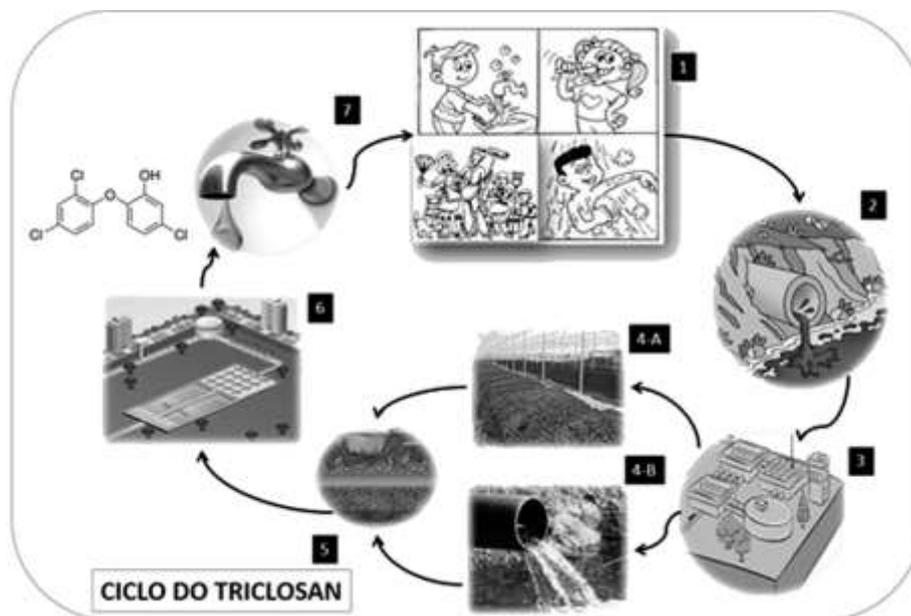
A fotodegradação do TCS gera vários subprodutos bio-acumuláveis e lipofílicos, como é o caso do metil-triclosan (MTCS), proveniente da reação de metilação biológica (LINDSTRÖM et al., 2002). A fotodegradação, com a luz ou com a radiação UV, promove a conversão do TCS em dioxinas (monoclorofenol e 2,4-diclorofenol), o que ocorre com três dias de exposição à luz artificial, tanto na água do mar quanto na água doce (ARANAMI; READMAN, 2007; FANG et al., 2010).

1.1.1 Ciclo do Triclosan

Os efluentes domésticos e industriais são conduzidos para estações de tratamento de esgoto (ETE). Porém, grande parte de compostos de pequeno tamanho como os contaminantes emergentes não são removidos e acabam por retornar aos corpos d'água. Os trabalhos com contaminação das águas no passado sempre estiveram relacionados apenas à contaminação de origem industrial e agrícola, sendo que pouco se conhecia sobre a contaminação por fármacos e produtos de higiene pessoal devido à dificuldade de detecção destes produtos pelos métodos analíticos disponíveis na época, uma vez que estão presentes na ordem de nano a microgramas (BILA; DEZOTTI, 2003).

A figura 2 apresenta o ciclo do triclosan no meio ambiente. O triclosan advindo de vários produtos do nosso dia-a-dia (sabonete, creme dental, produtos de limpeza, cremes e outros) pode ser lançado nos corpos d'água através das residências. Pode-se denotar o lançamento de efluentes em (1), os quais serão encaminhados para estações de tratamento de esgoto (3) através das redes coletoras de esgoto (2). O triclosan não é removido dos corpos d'água nas ETEs, podendo então seguir dois caminhos. Um deles consiste na sua remoção junto ao lodo ativo e subsequente utilização em terrenos como adubo orgânico em solos, provocando a contaminação dos lençóis freáticos com a penetração do triclosan via solo (4-A). No outro caminho o triclosan continua o percurso do tratamento de esgoto até os rios (4-B), afetando os lençóis freáticos (5). Assim, o triclosan, através das redes coletoras de água potável, segue o caminho para Estações de Tratamento de água (ETA) (6) onde pode vir a reagir com o cloro e formar compostos extremamente perigosos para os organismos vivos. Enfim, a água potável com triclosan chega para o consumo nas residências (7), fechando o ciclo. Adaptado de BILA; DEZOTTI, (2003).

Figura 2: Ciclo do triclosan no meio ambiente.



1- Uso de produtos diários com triclosan. Os produtos do dia-a-dia que apresentam o triclosan em sua composição liberam este composto nas águas residuais. 2- As águas residuais com o TCS seguem para as estações de tratamento de esgoto. 3- ETE (Estações de Tratamento de Esgoto) não conseguem eliminar o TCS podendo ir para o lodo ativado que será utilizado como fertilizante (4-A) ou ir para as águas brutas (4-B), em ambos os caminhos contaminando o lençol freático (5), indo para a Estação de Tratamento de Água (6) e retornando para a torneira (7).

1.1.2. Presença de Triclosan no Ambiente

A literatura aponta concentrações de triclosan variando entre $1,3 \times 10^{-5}$ ng.L⁻¹ a $1,3 \times 10^{-4}$ ng.L⁻¹ em diversos ambientes (Tabela 3).

Elevadas concentrações de triclosan (TCS) foram encontradas no rio Pearl, no sul da China, na ordem de 478 ng.L⁻¹ (ZHAO et al., 2010a) até 1023 ng.L⁻¹ (PENG et al., 2008). Fatores como elevada densidade populacional e construções ilegais nas proximidades de rios e pântanos certamente contribuem para a presença dessas elevadas concentrações de triclosan (WU et al., 2007; CHAU et al., 2008, (ZHAO et al., 2010a). Na Índia, altas concentrações de TCS também foram encontradas nos rios Kaveri, Vellar e Tamiraparani, com valores de 3.800 ng.L⁻¹, 5.160 ng.L⁻¹ e 944 ng.L⁻¹, respectivamente (RAMASWAMY et al., 2011).

As concentrações de TCS nos corpos d'água também variam ao longo do tempo. Em 2006, por exemplo, FAIR et al. (2009) encontraram 0,6 ng.L⁻¹ de TCS nas águas do rio Lagoon na Índia e, em 2008, 7,5 ng.L⁻¹ foram encontrados no mesmo local de análise.

Na Europa, o TCS foi encontrado em águas superficiais na Alemanha, Itália, Grécia, Eslovênia, Espanha, Romênia, Suécia, e Reino Unido, em concentrações acima de 285 ng.L⁻¹. Na Alemanha, as concentrações de triclosan no rio Ruhr, numa área industrializada e de densidade populacional elevada, variam de 3 a 10 ng.L⁻¹ na água potável. Já nas águas superficiais marinhas da Baía Bight (Alemanha), as concentrações de TCS próximo a estuários foram de 1,21 ng.L⁻¹ a 6,87 ng.L⁻¹ (XIE et al., 2008). A concentração de TCS em lagos e rios na Suíça variou de 0,4 a 74 ng.L⁻¹ (SINGER et al., 2002) e de 19 a 80 ng.L⁻¹ no Reino Unido (SABALIUNAS et al., 2003).

No canal Tone, no Japão, as concentrações de TCS em águas superficiais variaram de 55 a 134 ng. L⁻¹ (NISHI; KAWAKAMI; ONODERA, 2008). Pode-se encontrar em outros trabalhos os seguintes valores: na Inglaterra (corpos d'água) 95 ng.L⁻¹, na Espanha 46-184 ng.L⁻¹ e na Suíça de 20 a 190 ng.L⁻¹ (BENDZ et al., 2005; DE SOUSA et al., 2014; KASPRZYK-HORDERN; DINSDALE; GUWY, 2009).

No Brasil, o TCS é regulado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), sendo que a máxima concentração autorizada em produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes é de 0,3%. Contudo, não há legislação sobre limites permitidos para o ambiente. Nos Estados Unidos, o TCS é regulado por duas agências, a *Environmental Protection Agency* (EPA) e a *Food and Drug Administration* (FDA), de maneira que sua utilização como pesticida

é regulada pela EPA e sua utilização nos demais produtos citados anteriormente, regulada pela FDA.

Apesar de haver a detecção do TCS em águas de consumo residencial (provindas de estações de tratamento de água), tais dados têm sido pouco divulgados e não se tem um limite estabelecido para a concentração máxima permitida nessas águas (KANTIANI et al., 2008).

De acordo com RULE et al. (2005), KUSTER et al. (2008) e BENOTTI et al. (2009), o cloro adicionado em estações de tratamento de água reage com o TCS produzindo clorofenóis, que consistem em compostos altamente tóxicos. Estes não são contabilizados nas análises da concentração total de TCS, o que leva a valores subestimados de TCS na água potável.

Há ainda poucos dados referentes às concentrações de TCS nas águas brasileiras. Estudos realizados em rios do estado de São Paulo, integrantes da Bacia do Paraná, revelaram a presença de TCS em concentrações médias de $0,00475 \mu\text{g.L}^{-1}$ no Rio Pirai e de $0,0695 \mu\text{g.L}^{-1}$ no Rio Jundiaí (DE SOUSA et al., 2014). Já em rios de Capivari, Atibaia, Sorocaba, Cotia e São José do Rio Preto, valores médios de $0,0022$ a $0,0066 \mu\text{g.L}^{-1}$ foram registrados (MONTAGNER et al., 2014).

CAMPANHA e colaboradores (2015) monitoraram, por 3 anos, os contaminantes urbanos (incluindo o TCS) em torno do rio Monjolinho, na cidade de São Carlos-SP. O TCS foi detectado em 80% das amostras, com valores médios de $0,0352 \mu\text{g.L}^{-1}$ e valor máximo de $0,281 \mu\text{g.L}^{-1}$, valores estes próximos aos encontrados no rio Jundiaí ($0,00495$ - $0,324 \mu\text{g.L}^{-1}$) (DE SOUSA et al., 2014).

Um outro fator importante a ser considerado é a acumulação de TCS nos sedimentos. AGÜERA et al., (2003) estudaram uma estação de tratamento de esgoto (ETE) na Espanha e encontraram $22 \mu\text{g.L}^{-1}$ de TCS em amostras de efluentes tratados enquanto que, nos sedimentos, concentrações acima de $130,7 \mu\text{g.L}^{-1}$ foram encontradas. Cabe ressaltar que o ambiente marinho recebe continuamente os efluentes de ETES e o acúmulo de TCS em seus sedimentos também deve ser considerado.

Devido às suas propriedades físicas e químicas, o TCS se acumula no lodo e matéria orgânica em concentrações que variam, em média, de $0,4$ a 30mg.Kg^{-1} (SINGER et al., 2002 ;HEIDLER; HALDEN, 2007; LANGDON et al., 2012).

Diferentes concentrações de TCS foram detectadas em solos contaminados (TOPP et al., 2008) (EDWARDS et al., 2009). O período de meia vida para o TCS em resíduos sólidos é de 540 dias, mas informações de longo período são limitadas, variando muito de acordo com as condições ambientais (HALDEN; PAULL, 2005).

TABELA 3: Concentrações de triclosan encontradas em corpos d'água ao redor do mundo

Amostragem	País	Concentração de TCS	Referência
Riachos naturais/rios	USA	Até 2,3 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	KOLPIN et al., 2002 MORRALL et al., 2004
	Suíça	0,074 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	OKUMURA; NISHIKAWA, 1996
	Alemanha	0,01 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	BESTER, 2005
	Australia	0,075 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	YING; KOOKANA, 2007
	Japão	0,0006 - 0,0059 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	COOGAN; LA POINT, 2008 (ZHAO et al., 2010b)
	China	0,011 - 0,478 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	
	Espanha (Barcelona)	0,010 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	KANTIANI et al., 2008
Riachos com entradas de águas residuais cruas	Suíça	0,011 - 0,098 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	SINGER et al., 2002
	E.U.A	1,6 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	HALDEN; PAULL, 2005
	E.U.A (Texas)	2,7 -26,8 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	WALTMAN; VENABLES; WALLER, 2006

1.1.3. Contaminação da Biota com Triclosan

As algas nos corpos d'água são as fontes iniciais de contaminação pelo TCS constituindo-se os produtores primários da cadeia trófica, quando poluídos pelo TCS, provocam a transferência do poluente para os consumidores, principalmente para os peixes (COOGAN et al., 2007 e SALIERNO; LOPES; RIVERA, 2016).

A contaminação com TCS tem sido relatada principalmente em organismos de água doce, em diferentes níveis tróficos, incluindo algas, crustáceos e peixes, em concentrações variando de 0,24 a 4,4 $\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ (ADOLFSSON-ERICI et al., 2002). Entretanto, concentrações mais elevadas têm sido descritas. Adolfsson-erici et al., (2002), por exemplo, encontraram TCS na concentração de 120 $\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ no fígado de truta, *Oncorhynchus mykiss* (ADOLFSSON-ERICI et al., 2002).

TATARAZAKO et al., (2004) determinaram a toxicidade aguda do TCS em uma bactéria (*Vibrio fischeri*), em uma microalga (*Selenastrum capricornutum*), num crustáceo (*Ceriodaphnia dubia*) e em peixes (*Danio rerio* e *Oryzias latipes*). Como resultado, a bactéria,

o crustáceo e os peixes apresentaram sensibilidades semelhantes ao TCS, com valores de concentração letal para 25% dos organismos (CL₂₅) de 0,07 mg.L⁻¹ (ou 70 µg.L⁻¹) a 0,29 mg.L⁻¹ (ou 290 µg.L⁻¹) de TCS. Em contraste, a microalga foi cerca de 30 a 80 vezes mais sensível à toxicidade do TCS (CL₂₅ = 0,0034 mg.L⁻¹ ou 3,4 µg.L⁻¹) que os demais organismos testados. Esse resultado indica que o TCS exerce uma influência marcante sobre as algas, que são importantes produtores primários no ecossistema e, por conseguinte, a eventual destruição do equilíbrio do ecossistema é esperada se o TCS é descartado no meio ambiente em níveis elevados.

Alguns estudos determinaram a sensibilidade de peixes ao TCS por meio da determinação da letalidade deste composto para 50% dos indivíduos durante 96 h (CL₅₀ 96h) e, apesar de poucas espécies terem sido estudadas, aparentemente a letalidade é espécie-específica. A tabela 4 apresenta alguns valores de CL₅₀ para diferentes espécies de peixes.

Tabela 4: Valores de CL₅₀ 96h para o triclosan em diferentes espécies de peixes

Espécie	CL₅₀	Referência
<i>Pimephales promelas</i> (Cyprinidae)	260 µg.L ⁻¹	ORVOS et al. (2002)
<i>Lepomis macrochirus</i> (Centrarchidae)	370 µg.L ⁻¹	ORVOS et al. (2002)
<i>Pangasianodon hypophthalmus</i> (Pangasiidae)	1458 µg L ⁻¹	SAHU et al. (2018)
<i>Xiphophorus helleri</i> (Poeciliidae)	1470 µg L ⁻¹	LIANG et al. (2013)
<i>Oryzias latipes</i> (Adrianichthyidae) - adultos	1700 µg L ⁻¹	NASSEF et al. (2010)
<i>Oryzias latipes</i> (Adrianichthyidae) - embriões	399 µg L ⁻¹	ISHIBASHI et al. (2004)
<i>Oryzias latipes</i> (Adrianichthyidae) - larvas	602 µg L ⁻¹	ISHIBASHI et al. (2004)
<i>Anabas testudineus</i> (Anabantidae)	1767 µg.L ⁻¹	PRIYATHA e CHITRA, (2018)
<i>Oreochromis niloticus</i>	2810 µg.L ⁻¹	VIJITHA et al. (2017)

Ademais, a sensibilidade ao TCS é maior nos estágios iniciais de desenvolvimento que nos adultos. PALENSKE & DZIALOWSKI (2010) estudaram a toxicidade ontogenética e espécie-específica do TCS em larvas de anfíbios das espécies *Acris crepitans blanchardii*, *Bufo* (atualmente *Rhinella*) *woodhousii woodhousii*, *Rana* (atualmente *Lithobates*) *sphenocephala sphenocephalus*) e *Xenopus laevis*. Os fatores de bioacumulação para *X. laevis*, *B. woodhousii woodhousii* e *R. sphenocephala* também foram determinados. A toxicidade do TCS foi

dependente do estágio de maturação e as larvas de *X. laevis* foram mais vulneráveis durante os 2 primeiros estágios de desenvolvimento. Os autores encontraram os seguintes valores de CL_{50} : 259–664 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (*X. laevis*), 367 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (*A. crepitans blanchardii*), 152 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (*B. woodhousii woodhousii*) e 562 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (*R. sphenoccephala*). Nesse estudo, a tomada de TCS pelos tecidos foi espécie-específica e dependente do estágio de desenvolvimento e massa corpórea média, sendo que os fatores de bioacumulação variaram de 44 em *X. laevis* para até 740 em *B. woodhousii woodhousii*.

Em organismos marinhos, FAIR et al., (2009) encontraram TCS no plasma sanguíneo do golfinho-roaz (ou golfinho-nariz-de-garrafa), *Tursiops truncatus*, em concentrações que variaram de 0,025 ng.g^{-1} a 0,270 ng.g^{-1} , sendo que nas amostras da água do mar, a concentração média foi de 7,5 ng.L^{-1} .

Alguns trabalhos relatam a presença desse composto em fluidos biológicos humanos. CALAFAT et al., (2008) coletaram 2517 amostras de urina de homens e mulheres com diferentes idades e detectaram TCS em 74.6% das amostras, com concentrações variando entre 2,4 a 3790 $\mu\text{g.L}^{-1}$. As concentrações variaram com a idade e a condição socioeconômica (maior entre indivíduos ao redor de 30 anos e com maiores salários), mas não houve relação com raça/etnia ou sexo. ADOLFSSON-ERICI et al., (2002) estudaram 5 amostras aleatórias de leite humano obtido no *Mothers' Milk Center* em Estocolmo (Suécia) e encontraram TCS nas 5 amostras, com concentrações variando de 20 a 300 $\mu\text{g/Kg}$.

1.1.4. Efeitos do triclosan em vertebrados

Diversos estudos têm demonstrado que o triclosan se bioacumula em animais gerando efeitos deletérios em diversos órgãos e sistemas como, por exemplo, no sistema endócrino (FAIR et al., 2009; RAUT; ANGUS, 2010). Foi demonstrado que, em humanos, o TCS é absorvido pelas glândulas salivares e trato urinário (CALAFAT et al., 2008) e atua como disruptor endócrino (RAUT; ANGUS, 2010; CROFTON et al., 2007; ZORRILLA et al., 2009; STOKER; GIBSON; ZORRILLA, 2010; PAUL et al., 2010).

Alguns estudos com diferentes espécies animais têm demonstrado que o TCS altera níveis hormonais, o que pode resultar em neurotoxicidade, redução da função tireoideana e até mesmo crescimento de células tumorais mamárias.(GEE et al., 2008; JAMES et al., 2010; FAIR et al., 2009).

ZORRILLA et al. (2009) verificaram que a exposição ao triclosan altera significativamente a concentração de hormônios tireoideanos em ratos machos adultos.

SCHULTZ, BARTELL e SCHOENFUSS, (2012) estudaram os efeitos da exposição do peixe “fathead minnows” (*Pimephales promelas*) ao TCS e verificaram modificações no desenvolvimento larval, no tamanho das gônadas e na concentração de vitelogenina.

WANG et al. (2018) pesquisaram o desenvolvimento gonadal e a reprodução do *Oryzias latipes* após a exposição de 100 dias a uma mistura binária de estradiol com triclosan (117,9 ng/L TCS e 2,4 ng/L β E2) na superfície da água e verificaram efeitos adversos no desenvolvimento testicular e na reprodução dos peixes.

No coração o TCS pode atuar na sinalização entre os canais cálcio tipo L e nos receptores de rianodina, alterando a concentração de cálcio intracelular, culminando assim num desequilíbrio iônico e fisiopatologias cardíacas (CHEREDNICHENKO et al., 2012).

Desse modo, presume-se que alterações na expressão das proteínas atuantes no manejo de cálcio durante o processo de acoplamento excitação-contração estejam entre as consequências da exposição ao TCS. Experimentos com zebra fish (*Danio rerio*) vivos em exposições agudas ao TCS (SALEY et al., 2016) mostraram alterações nos parâmetros funcionais da musculatura cardíaca (0,4; 40; 400 μ g.L⁻¹).

1.2 Demanda Bioquímica de Oxigênio na Água

Dentre os gases dissolvidos na água, o oxigênio é um dos mais importantes na dinâmica e caracterização dos ecossistemas (ESTEVES, 1998). As principais fontes de oxigênio para a água são a atmosférica e a fotossíntese, e o consumo deste se dá através da decomposição da matéria orgânica (oxidação), e por perdas para atmosfera, respiração de organismos aquáticos, nitrificação e oxidação química abiótica de substâncias como íons metálicos-ferro (II) e manganês (II) e entre outros representados na figura 3.

Nos ambientes aquáticos não poluídos, o material que se oxida pelo oxigênio dissolvido na água é a matéria orgânica de origem biológica, oriunda de plantas mortas e restos de animais, sendo esse processo denominado degradação aeróbica, o qual ocorre em águas ricas em oxigênio. A coluna d'água possui diferentes concentrações de oxigênio dissolvido. As colunas inferiores possuem uma estabilidade maior com o oxigênio e troca oxigênio com as colunas superiores que trocam oxigênio com o ar atmosférico. Nos rios e lagos com as camadas superiores congeladas ocorre o bloqueio da luz na água e provoca a diminuição da fotossíntese,

provocando uma condição hipóxica na água. (HILL et al., 1996), (CONNELL, 2005) (FIORUCCI; BENEDETTI FILHO, 2005).

De maneira geral, existem duas formas de entrada de oxigênio na água (Figura. 3), sendo a primeira pela atividade da fotossíntese realizada pelos organismos que compõem o fitoplâncton, os quais retiram o gás carbônico da água e liberam oxigênio durante o dia. A segunda se dá pela troca de oxigênio na superfície da água em contato direto com o ar.

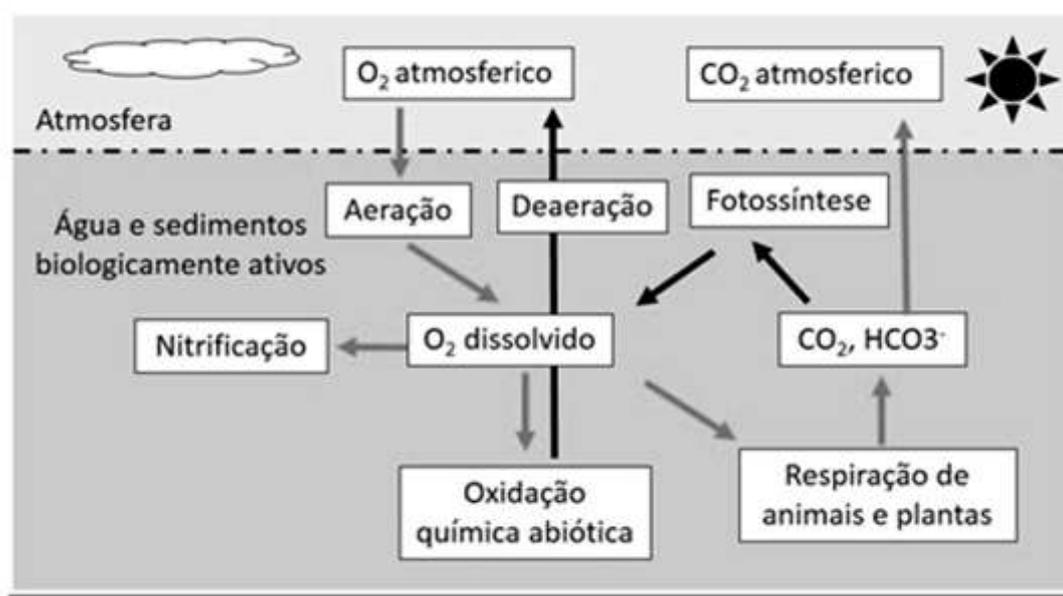
As águas dulcícolas tropicais constituem um vasto ambiente para investigação de adaptações ao ambiente por possui características de grandes oscilações diárias e sazonais no que tange suas propriedades químicas e físicas, além da coexistência de espécies estreitamente relacionadas, com habitats similares e soluções completamente diferentes para os mesmos problemas (ANELLI-JUNIOR , 2010).

A maioria dos peixes captura o oxigênio por meio de um complexo órgão branquial e esse gás é utilizado para respiração celular. A sua disponibilidade em níveis apropriados é essencial para que os peixes possam se alimentar e crescer da forma adequada. Alguns autores sugerem que para as espécies de água fria, a concentração de oxigênio dissolvido deve ser sempre superior a 5 mg/L e, para as espécies de águas quentes (os tropicais) o ideal é uma concentração acima de 3 mg/L (JONES, 1952; BREITBURG, 2002; WU et al., 2003; BREITBURG et al., 2009).

Nas situações em que a concentração pode ir abaixo desses valores, os animais poderão sobreviver, porem resultará em desempenho aquém do esperado. Níveis abaixo de 1 mg/L são letais para a maioria das espécies, se expostas por muitas horas a essa condição (WU et al., 2003).

Dessa forma, vivendo em ambientes tão variáveis, as espécies de peixes tropicais tornaram-se adaptadas a condições extremas nunca enfrentadas por vertebrados de respiração aérea. As respostas adaptativas são iniciadas tão logo o animal detecte uma mudança no ambiente, diretamente, por meio de seu sistema sensorial, ou indiretamente, pelos efeitos sobre seus processos fisiológicos e bioquímico (FIORUCCI; BENEDETTI FILHO, 2005).

Figura 3: Balanço de oxigênio dissolvido nos sistemas aquáticos



(Adaptada de FIORUCCI e BENEDETTI FILHO, 2005).

Nos corpos d'água, quando ocorre o fenômeno de queda do suprimento de oxigênio, ou seja, diminuição, essa condição de baixo oxigênio é denominada hipóxia. A ocorrência de um estado crítico de hipóxia levando a uma depleção total do O_2 dissolvido na água é conhecida como anóxia (BREITBURG et al., 2009).

Há uma infinidade de fatores que ocasionam hipóxia na água, das quais podemos citar: respiração das algas, inundações sazonais, estratificações, lagos cobertos por gelos, isolamento de corpo de água densamente povoados por vegetação, causas mais recentes derivadas das atividades humanas (antropogênicas), dentre outras (CHAPMAN; MCKENZIE, 2009).

Os animais aquáticos são submetidos a grandes variações de concentração de oxigênio se comparados com animais de respiração aérea. Isto porque a difusão dos gases no ar ocorre de forma acelerada em comparação com os corpos d'água, dessa forma a água possui reação de difusão menor do gás podendo desenvolver a hipóxia facilmente (CHAPMAN; MCKENZIE, 2009). Ainda, de acordo com MOYES E SCHULTE (2010), as alterações nos níveis de oxigênio na água podem ou não ser acompanhadas por alterações no dióxido de carbono.

Há um grande número de animais aquáticos que resistem a períodos muito longos de hipóxia, que são submetidos a uma saturação de oxigênio crítico (O_{crit}) muito baixa, não sendo particularidade dos peixes, mas também dos invertebrados. Os peixes utilizam uma variedade de vias de ajustes no sistema respiratório e cardiovascular para manter o fornecimento de

oxigênio em face à redução deste. A hipóxia aquática causa aumento na ventilação das brânquias em muitos peixes ocasionado por estímulos quimiorreceptores nessas condições hipóxicas. Nesta situação faz-se necessário o aumento do fluxo de água com o intuito de manter os mesmos níveis de conteúdo de oxigênio opercular (MOYES E SCHULTE, 2010).

Quando os peixes são submetidos à hipóxia ambiental, dá-se um aumento na ventilação branquial acompanhado pela redução da frequência cardíaca, ou seja, o volume de água que atravessa as brânquias é maior do que em condições de normóxia. A bradicardia causa um aumento no tempo de passagem do sangue através das brânquias o que resulta em uma maximização na eficiência da transferência do O₂ da água para os capilares lamelares e daí para a circulação sistêmica (CAMPBELL; EGGINTON, 2007) e (TAYLOR; JORDAN; COOTE, 1999).

Dependendo da temperatura e da salinidade, a água pode conter de 20 (vinte) a 40 (quarenta) vezes menos oxigênio por volume difundido do que no ar. Essas baixas solubilidade e difusão do oxigênio na água são combinadas com os fatores ambientais que levam o desenvolvimento da hipóxia e a anóxia (BREITBURG et al., 2009).

1.3 Função Cardiorrespiratória de Peixes

A maioria das espécies de peixes apresenta respiração branquial. As brânquias são ventiladas com um fluxo unidirecional de água, garantido pelo bombeamento ativo por meio do trabalho da musculatura esquelética nas cavidades bucal e operculares. As brânquias consistem geralmente em quatro arcos branquiais que se estendem em duas fileiras de filamentos branquiais, os quais possuem várias lamelas secundárias, as quais são estruturas achatadas e densamente enfileiradas onde ocorrem as trocas gasosas. À medida que a água flui entre essas lamelas em uma direção, o fluxo sanguíneo flui em direção oposta, fluxo este denominado contracorrente (Figura 4) (MOYES e SCHULTE, 2010).

Os peixes teleósteos exibem respostas respiratórias em relação a diminuição da concentração de O₂ ambiental diferem entre as espécies. O consumo de O₂ ($\dot{M}O_2$) varia de acordo com a capacidade de regulação da tomada de O₂ da espécie em relação à disponibilidade desse gás no ambiente. Para as espécies oxiconformistas, a $\dot{M}O_2$ varia diretamente com a tensão de O₂ ambiental, ao passo que nos oxirreguladores a $\dot{M}O_2$ é independente de tal variável (DAVIS, 1975).

A saturação de O_2 (O_{crit} ou PcO_2) representa o limite da capacidade do animal em manter sua $\dot{M}O_2$ constante em resposta à redução do O_2 ambiental. Abaixo da O_{crit} a espécie se comporta como oxiconformista e a $\dot{M}O_2$ passa a ser dependente da disponibilidade de O_2 do meio. Alguns estudos demonstraram que a O_{crit} não é caracterizada apenas pela mudança no padrão de consumo de oxigênio, mas também pelo início do metabolismo energético anaeróbico (DALLA VIA et al., 1994; PÖRTNER; GRIESHABER, 1993).

A ventilação branquial (\dot{V}_G) em resposta à hipóxia é imediatamente aumentada através da elevação da frequência respiratória (f_R) e/ou do volume ventilatório (\dot{V}_G). Segundo Hughes, (1970), a difusão de gases através da superfície respiratória depende não apenas do volume ventilatório e da velocidade do fluxo de água, mas é determinada também pela área de difusão, pelo gradiente de pressão parcial dos gases entre a água e o sangue e pela distância de difusão. A difusão de O_2 nas brânquias pode ser aumentada pelo recrutamento de lamelas secundárias (SATCHELL, 1991; ALTIMIRAS; AISSAOUI; TORT, 1995 JUNIOR; CARLOS, 2010).

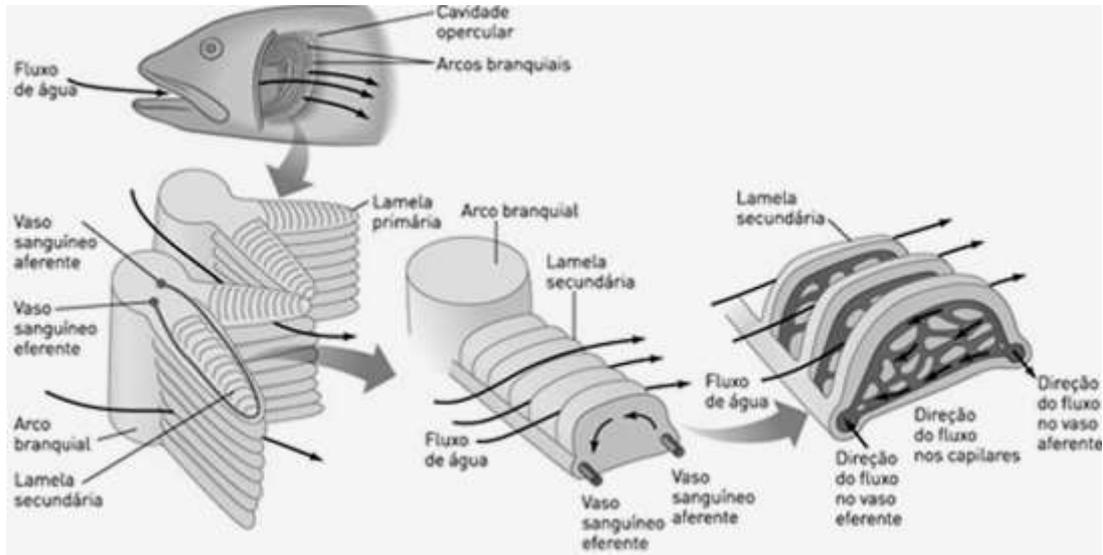
O coração dos peixes teleósteos é um órgão formado por quatro câmaras em série: seio venoso, átrio, ventrículo e bulbo arterioso (Figura 5). O seio venoso recebe o sangue venoso da circulação. O átrio é um amplo saco muscular de parede fina, capaz de gerar pressão suficiente apenas para encher o ventrículo, que possui parede muscular grossa (SATCHELL, 1991).

O ventrículo é a principal câmara geradora de pressão do coração e abrange de 58% a 85% de seu peso. Sua forma é muito variável nas diferentes espécies, podem ser tubulares ou piramidais. A parede do ventrículo frequentemente consiste em duas camadas, um endocárdio esponjoso, que representa a maior parte da massa ventricular, e uma camada compacta externa (RANTIN e KALININ; 2014).

Nos teleósteos em que está presente, a camada compacta é suprida com uma artéria coronária provinda do lado arterializado das brânquias enquanto que o endocárdio esponjoso sempre recebe todo o O_2 e nutrientes diretamente do sangue do lúmen ventricular (ou seja, do sangue venoso). A quarta câmara, o bulbo arterioso, é elástica devido à presença de elementos elásticos e músculo liso em sua parede. O sangue venoso, vindo da circulação sistêmica, passa pelas câmaras e é direcionado, via aorta ventral, para as brânquias onde ocorre a oxigenação (RANTIN e KALININ; 2014).

O trabalho eficiente do coração depende da ativação sequencial das câmaras (figura 5). O coração dos peixes, como dos demais vertebrados, é miogênico, possuindo tecido marca-passo na junção sinoatrial, o qual dispara potenciais de ação de forma lenta e espontânea (RANTIN e KALININ; 2014).

Figura 4: Estrutura branquial de um teleósteo. Destaque para o fluxo contracorrente entre a água e o sangue



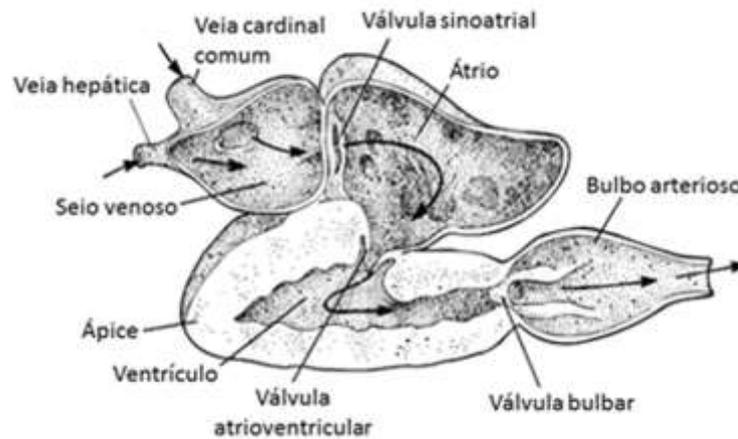
(Fonte: MOYES & SCHULTE, 2010).

A função do coração é suprir sangue aos tecidos e gerar e sustentar a pressão sistólica necessária para uma adequada perfusão dos tecidos. A contração do coração por suas paredes musculares precisa gerar pressão suficiente para propelir o sangue da câmara cardíaca (ventrículo) para a aorta ventral. Além disso, essas contrações precisam ocorrer com uma determinada frequência para que o sangue chegue aos tecidos com uma certa constância. O número de contrações cardíacas por unidade de tempo, necessário à manutenção desse suprimento adequado de sangue aos tecidos, é chamado de frequência cardíaca (f_H).

Devido à boa condutividade dos fluidos corpóreos e dos tecidos, os fenômenos elétricos que ocorrem nas fibras miocárdicas durante o ciclo cardíaco podem ser registrados na superfície corpórea utilizando-se a eletrocardiografia. Os peixes teleósteos apresentam ondas eletrocardiográficas com morfologia típica dos demais vertebrados, ou seja, com uma onda P (correspondente à despolarização atrial), um complexo QRS (correspondente à despolarização ventricular) e uma onda T (correspondente à repolarização ventricular), como mostrado na figura 6.

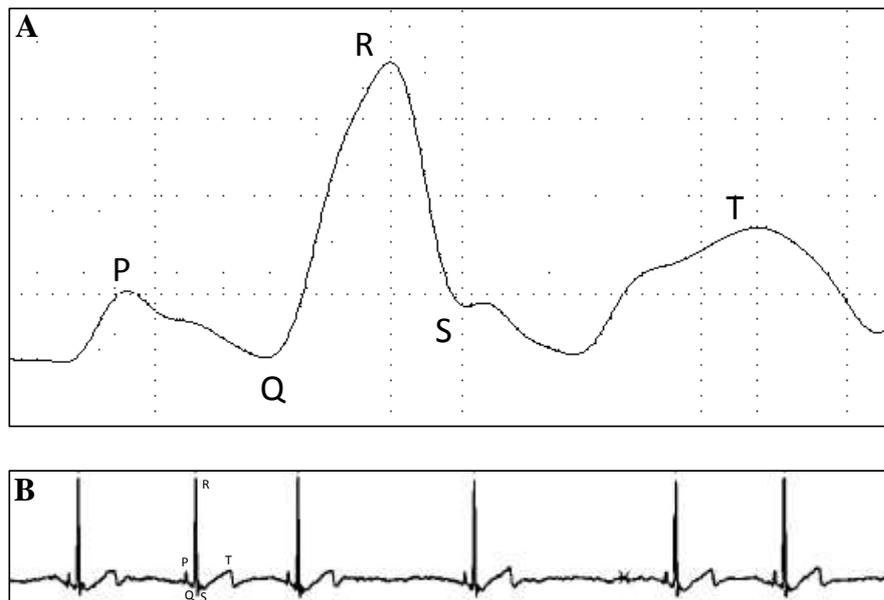
A análise da morfologia e duração das ondas e seus respectivos segmentos e intervalos pode fornecer importantes informações sobre a função cardíaca dos peixes.

Figura 5: Representação esquemática do coração de peixes teleósteos



Corte longitudinal, mostrando as quatro câmaras em série (seio venoso, átrio, ventrículo e bulbo arterioso). As setas representam a direção do fluxo de sangue durante seu trajeto pelo coração (Adaptado de RANTIN E KALININ; 2014).

Figura 6: Traçado eletrocardiográfico de matrinxã, *Brycon amazonicus*.



A) Eletrocardiograma (ECG) de matrinxã, *Brycon amazonicus*, registrado na derivação DI da eletrocardiografia padrão, mostrando a onda P (correspondente à despolarização das fibras atriais), complexo QRS (correspondente à despolarização das fibras ventriculares) e onda T (correspondente à repolarização das fibras ventriculares). B) O registro realizado tendo a onda R como parâmetro para a f_H (frequência cardíaca).

1.4 Respirometria de Peixes

O consumo de O₂ ($\dot{M}O_2$) é extensamente utilizado na fisiologia como um indicador biológico que integra a atividade metabólica global de um animal em resposta a fatores ambientais específicos, refletindo o gasto energético.

A $\dot{M}O_2$ em animais aquáticos pode ser medida por diversas técnicas que variam em complexidade e a acuracidade dos resultados obtidos. A maioria dessas técnicas é baseada nos seguintes procedimentos experimentais: sistema fechado ou estático, sistema aberto ou de fluxo constante e sistema fechado de fluxo intermitente.

1.4.1 Respirômetro de Sistema Fechado ou Estático

Sistema fechado ou estático (CECH e BRAUNER, 2011) é um modelo em que se mede o consumo de oxigênio do animal quando colocado em um recipiente fechado (respirômetro), sendo seu volume e temperatura mantidos constantes (Figura 7).

Nesse sistema (CECH e BRAUNER, 2011), pode ocorrer consumo de oxigênio por microrganismos (bactérias, algas e entre outros), interferindo nas medidas de tomada de oxigênio do peixe, sendo necessário descontar-se os valores da tomada de oxigênio sem o peixe.

O respirômetro deve ter um volume adequado para cada espécie de peixe. Segundo STEFFENSEN (1989), a definição do volume ideal do respirômetro pode ser definida através da seguinte equação:

$$Taxa = \frac{\text{Massa do Peixe (g)}}{\text{Volume do Respirômetro (ml)}} = \frac{1}{100} \leq x \leq \frac{1}{20}$$

O volume ideal, definido pela “*taxa*” pode ser encontrado pela razão do peso do peixe pelo volume do respirômetro e deve abranger o intervalo determinado acima, sendo o peso do peixe dado em gramas e o volume do respirômetro dado em mililitros (ml).

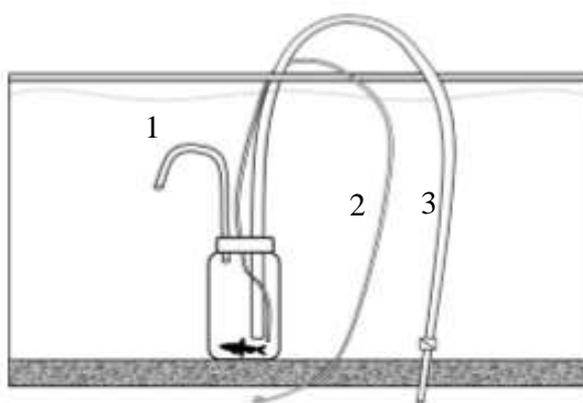
Na respirometria há vários fatores que podem alterar a solubilidade de oxigênio na água, entre eles a pressão atmosférica, temperatura, salinidade, turbulência da água e a atividade dos microrganismos na água. Estes fatores devem ser considerados no momento da análise das medidas do consumo de oxigênio.

O cálculo da $\dot{M}O_2$, denominado consumo de O_2 ($mgO_2 h^{-1}$), é realizado por meio da equação:

$$\dot{M}O_2 = (CO_{2(A)} - CO_{2(B)}) \cdot V/T \quad , \text{onde}$$

$CO_{2(A)}$ é a concentração inicial de O_2 no respirômetro ($mg O_2 \cdot L^{-1}$), $CO_{2(B)}$ é a concentração final de O_2 no respirômetro ($mg O_2 \cdot L^{-1}$), V é o volume do respirômetro (L), T é o tempo decorrido durante as medidas de O_2 (h).

Figura 7: Respirometria de Sistema fechado ou estático



Situado em um aquário o qual consiste de um frasco de vidro com uma tampa de borracha na qual (1) é o sifão de renovação da água do tanque para o respirômetro, (2) uma cânula na qual são retiradas as amostras de água por uma seringa e (3) é o sifão de escoamento na qual tem-se uma torneira para controlar a saída de água. A pequena movimentação do peixe e sua ventilação branquial fazem circular a água dentro do respirômetro. (Adaptada de (CECH; BRAUNER, 2011).

1.4.2 Sistema Aberto ou de Fluxo Constante

No sistema aberto ou de fluxo constante, mede-se o decréscimo das tensões de oxigênio da água que flui constantemente através do respirômetro contendo o animal. A precisão das medidas obtidas por este tipo de respirômetro é consideravelmente melhor do que a do sistema fechado. Esse sistema pode ser utilizado para uma grande variedade de animais aquáticos: lagostas, lagostins, caranguejos, siris, moluscos marinhos e de água doce, peixes, etc.

Para se medir as tensões (ou concentrações) de O_2 da água de entrada e saída do respirômetro de fluxo constante pode-se utilizar vários métodos. Um deles é o método de Winkler onde, através de uma série de reações químicas, determina-se as concentrações de O_2

volumetricamente. Outra forma de se medir a concentração ou a tensão de O₂ da água é através da utilização de analisadores de O₂. Por meio dessa técnica, a M_{O₂} é calculada pela equação:

$$\dot{M}_{O_2} = (C_{O_2(I)} - C_{O_2(O)})F, \text{ onde:}$$

C_{O₂(I)} é a concentração de O₂ que entra no respirômetro (mg O₂ L⁻¹), C_{O₂(O)} é a concentração de O₂ que sai do respirômetro (mg O₂ L⁻¹) e F é o fluxo da água através do respirômetro (L min⁻¹).

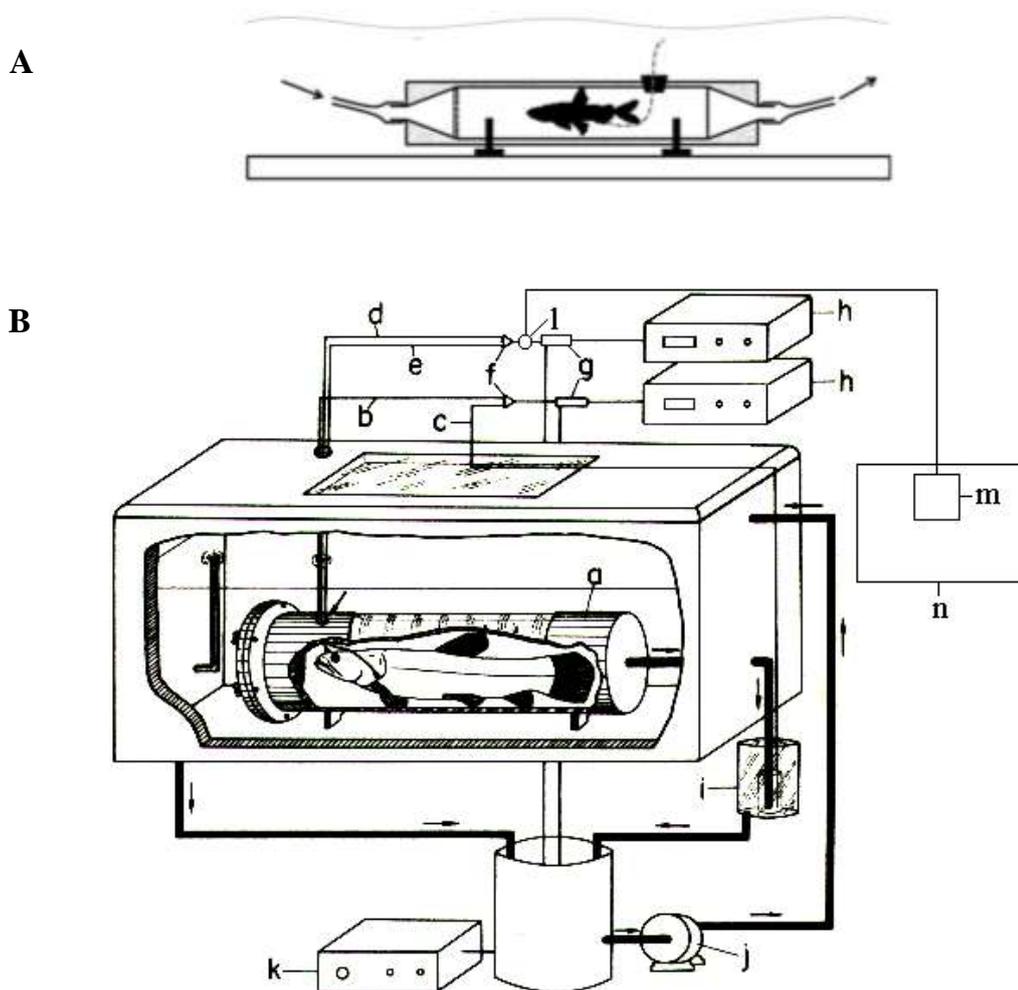
Um esquema do experimento utilizado na respirometria de fluxo constante é mostrado na Figura 8.

1.4.3 Sistema fechado de fluxo intermitente

A respirometria de fluxo intermitente combina elementos dos respirômetros aberto e fechado, excluindo toda problemática envolvida com medidas de organismos em condições hipóxicas e a produção de excretas nitrogenadas na água, alterando as aferições das análises.

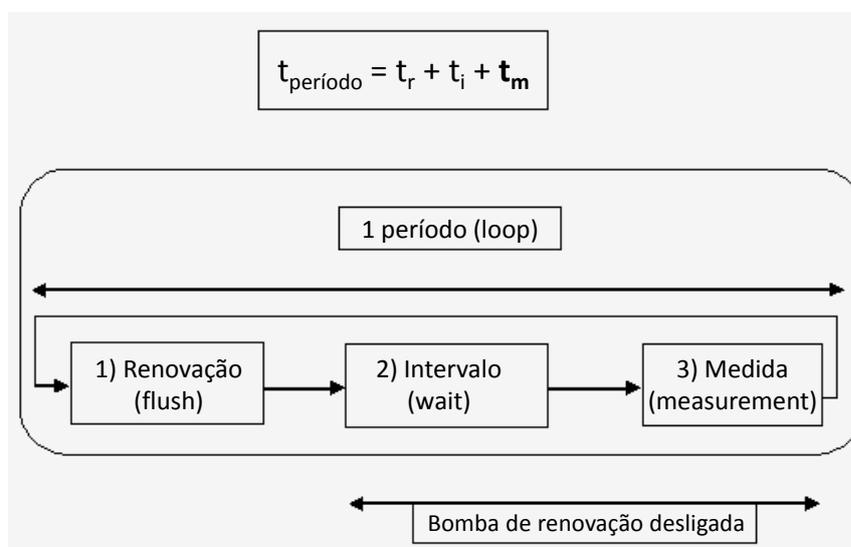
A respirometria fechada de fluxo intermitente (figura 9) consiste de uma série de curtos períodos experimentais com intervalos de renovação da água no respirômetro. Temos um completo ciclo de medidas que contempla as dinâmicas dos sistemas aberto e fechado, no qual são realizadas as aferições do ciclo metabólico por períodos de declínio de consumo. Dessa forma em (1) temos t_r como renovação (*flush*), t_i como intervalo (*wait*) e t_m (*measurement*) como aferição, ou seja, a realização da medida metabólica (Figura 9).

Figura 8: Respirômetro Aberto ou de Fluxo Constante.



(A): situado em um tanque com água consistindo em um tubo acrílico que afunila-se nas extremidades para minimizar o fluxo de água que entra no respirômetro, no qual em suas extremidades podem ser inseridos analisadores de oxigênio. A linha pontilhada pode ser uma cânula para mensurar os gases dissolvidos no sangue do peixe fora do respirômetro (Modificada de CECH; BRAUNER, 2011). No modelo (B) temos o esquema do sistema empregado nas medidas dos parâmetros respiratórios e medidas indiretas da ventilação branquial: (a) respirômetro; (b) catéter para a tomada da água de entrada do respirômetro (P_{eO_2}); (c) catéter para a tomada da água de saída do respirômetro (P_{sO_2}); (d) catéter para a tomada a água da cavidade bucal (P_{inspO_2}); (e) catéter para a tomada da água da cavidade opercular (P_{expO_2}); (f) torneira de 3 vias; (g) cubeta termostatizada contendo o eletrodo de O_2 ; (h) analisador de O_2 ; (i) frasco de ajuste de fluxo através do respirômetro; (j) bomba de circulação de água no tanque experimental; (k) termostato, (l) transdutor de pressão; (m) amplificador de sinal do transdutor de pressão; (n) fisiógrafo (modificada de KALININ; RANTIN; GLASS, 1996).

Figura 9: Ciclo de medidas (loop) no respirômetro de fluxo intermitente



Um ciclo de medidas (loop) no respirômetro de fluxo intermitente consiste de três períodos. (1) A renovação, na qual a bomba de recirculação de água é ligada e renova a água no respirômetro com a água do tanque (t_r); (2) A bomba de renovação é desligada e temos um intervalo no qual o oxigênio do respirômetro é estabilizado com relação ao oxigênio do tanque experimental em alguns minutos e, (3) A mensurabilidade (t_m) na qual serão analisados os resultados por regressão linear (adaptado de SVENDSEN; BUSHNELL; STEFFENSEN, 2016).

1.4.4. Análises da Concentração de Oxigênio na Água

Os eletrodos de O_2 são equipamentos amplamente utilizados para as medidas de concentração de O_2 na água. Os eletrodos galvânicos baseiam-se em uma reação eletroquímica entre um ânodo e um cátodo para mensurar as concentrações de O_2 dissolvido na água. A limitação desse método deve-se, principalmente, à sensibilidade desses eletrodos à pressão e a temperatura. Além disso, não são recomendados para medidas em respirômetros de pequeno volume, pois suas reações eletroquímicas podem consumir o oxigênio durante as medidas, interferindo nos resultados obtidos (CLARK; SANDBLOM; JUTFELT, 2013).

Os sensores de fibra ótica, desenvolvidos mais recentemente, dependem de luz fluorescente como indicador de moléculas oxigênio. São, na sua maioria, menores que os eletrodos galvânicos, não são sensíveis à pressão e a temperatura e fornecem valores de tomadas de oxigênio ($\dot{M}O_2$) de melhor resolução e acuracidade, são suficientemente sensíveis para estudo com animais de pequeno tamanho como peixes na fase larval.

O método de Winkler é para medir o oxigênio dissolvido em líquidos, em geral, a água, sendo que, este método é muito utilizado para determinação de oxigênio. O método baseia-se

na oxidação do hidróxido manganoso (mangânês bivalente) no oxigênio dissolvido na água, a qual resulta na formação de um composto tetravalente, sendo que o iodo equivale a quantidade de oxigênio dissolvido na amostra de análise, ou seja, sua determinação por titulação com uma solução padrão de tiosulfato de sódio (SCHULEK, 1963).

1.5. O matrinxã, *Brycon amazonicus*

O matrinxã, *Brycon amazonicus*, é um peixe teleósteo de água doce Neotropical, nativo das bacias Amazônica e Araguaia-Tocantins (Figura 10). É uma espécie migratória, de piracema, percorrendo longas distâncias durante seus ciclos reprodutivos para alcançar os mananciais. Atravessam corredeiras e percursos de águas calmas e apresentam uma tolerância à hipóxia (MORO et al., 2013).

Figura 10: Exemplar de matrinxã, *B. amazonicus*



A régua apresenta escala em cm. (Extraída de ANELLI-JR, 2010).

É um peixe de escamas de corpo alongado, coloração prateada, com as nadadeiras escuras de coloração preta e possui uma mancha arredondada preta (escura) na região umeral. Anatomicamente pode chegar a medir mais de 100 cm de comprimento e pesar acima de 5 kg. É uma espécie onívora, alimentando-se de frutos, sementes, flores, insetos. (MORO et al.; 2013). De fácil comercialização em várias regiões do país, é bem aceito nos pesque-pague, possui uma carne saborosa e apreciada pelos consumidores, de rápido crescimento, atingindo o abate em 1 ano (HONCZARYK; AOKI, 2009).

Segundo a organização sistemática, a espécie em questão ocupa a seguinte posição:

Classe: OSTEICHTHYES

Superordem: OSTARIOPHYSI

Ordem: CHARACIFORMES

Família: CHARACIDAE

Subordem: CHARACOIDEI

Sub-Família: BRYCONINAE

Sub-Família: BRYCONINAE

Gênero: Brycon

Espécie: *Brycon amazonicus* (SPIX & AGASSIZ, 1829)

A função cardiorrespiratória do matrinxã já foi estudada tanto em condições controle quanto após a exposição às condições hipóxicas e a diferentes contaminantes (MONTEIRO, 2011; OLLE, 2007, ANELLI-Jr., 2010, THOMAZ, 2009), razão pela qual a espécie foi escolhida para o presente estudo.

Por tudo o que foi exposto e pela forte indicação de toxicidade do triclosan (TCS) para peixes, a presente proposta de estudo se fundamenta nas seguintes justificativas: Os trabalhos acima citados apontam para efeitos adversos do TCS nos peixes, mas não há estudos sobre possíveis alterações da função cardiorrespiratória destes animais; Os peixes estão frequentemente sujeitos a reduções na disponibilidade de O₂ dissolvido na água (hipóxia) e, para a sobrevivência em tais condições, os ajustes cardiorrespiratórios são fundamentais; Diferentes concentrações de TCS já foram detectadas em águas superficiais do Estado de São Paulo; O efeito combinado de xenobióticos e hipóxia aquática pode ser mais severo que os efeitos individuais, podendo impor riscos às espécies de peixes, comunidades e ecossistemas.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral do presente trabalho foi verificar os efeitos do triclosan (TCS) sobre as respostas respiratórias e cardíacas de um peixe teleósteo de água doce neotropical, o matrinxã, *Brycon amazonicus*.

O estudo teve como objetivos específicos:

1. Determinar uma concentração ambientalmente relevante de TCS suficiente para causar alterações respiratórias. Para tanto, a taxa metabólica (ou tomada de O₂ total - $\dot{M}O_2$) de exemplares de matrinxãs controle e expostos a diferentes concentrações de TCS (0,13 $\mu\text{g.L}^{-1}$, 1,3 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e 13 $\mu\text{g.L}^{-1}$) foi monitorada durante 96h.
2. A concentração de TCS selecionada foi utilizada para a determinação dos parâmetros cardiorrespiratórios em normóxia e durante hipóxia gradual. Para tanto, exemplares de peixes controle e expostos ao TCS foram utilizados para a avaliação dos seguintes parâmetros, em normoxia e hipóxia gradual:
 - a. Taxa metabólica (ou tomada de O₂ total - $\dot{M}O_2$);
 - b. Tensão crítica de oxigênio (PcO_2);
 - c. Parâmetros ventilatórios (ventilação branquial - \dot{V}_G ; frequência respiratória - f_R ; volume ventilatório - V_T e necessidade ventilatória - $\dot{V}_G/\dot{M}O_2$);
 - d. Frequência cardíaca *in vivo* (f_H)
3. Avaliar a expressão de proteínas envolvidas no manejo de cálcio no miocárdio ventricular em peixes controle e expostos ao TCS.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Todos os experimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de São Carlos - UFScar (Protocolo #6516130315).

3.1. Material

Exemplares de ambos os sexos de matrinxã, *Brycon amazonicus*, foram adquiridos da piscicultura e Estância Santa Maria no município de Santa Cruz da Conceição (SP) e transportados para o Laboratório de Zoofisiologia e Bioquímica Comparativa da UFSCar.

Em laboratório, os peixes foram mantidos em tanques de 1000 litros com recirculação de água de clorada (pH 7,0; DO₂ 6,5-7,3 mg.L⁻¹; dureza 48-56 mg.L⁻¹ como CaCO₃, alcalinidade 40-43 mg.L⁻¹ como CaCO₃ e condutividade 120-128 µS.cm⁻¹), conforme descrito por MONTEIRO (2011) aeração constante (condições normóxicas, P_{in}O₂ ≥ 135 mmHg), temperatura controlada (25 ± 1 °C) e sob fotoperíodo natural por um período de 90 dias para aclimação às condições laboratoriais. Durante o período de aclimação, os peixes foram alimentados *ad libitum* com ração comercial peletizada própria para peixes (Fri-Aqua® - 40 % proteína). A alimentação dos peixes foi suspensa por 24 horas antes do início dos experimentos para evitar efeitos prandiais e prevenir deposição de fezes ao longo dos experimentos.

Após o período de aclimação de 90 dias, os exemplares de *B. amazonicus* (m = 71,0 ± 2,7 g) foram divididos nos seguintes grupos experimentais: o grupo controle (n = 8), grupo exposto a 1,3 µg de TCS (n = 8) e grupo exposta a 13 µg de TCS (n = 8).

3.2. Métodos

No presente estudo, foram realizados experimentos prévios com medidas de concentração de O₂ da água utilizando-se eletrodos galvânicos, sensores de fibra ótica e o método de Winkler. Tais medidas foram realizadas em normóxia, sob condições controle (n = 12) e após a adição de 1,3 µg.L⁻¹ de triclosan (n = 12).

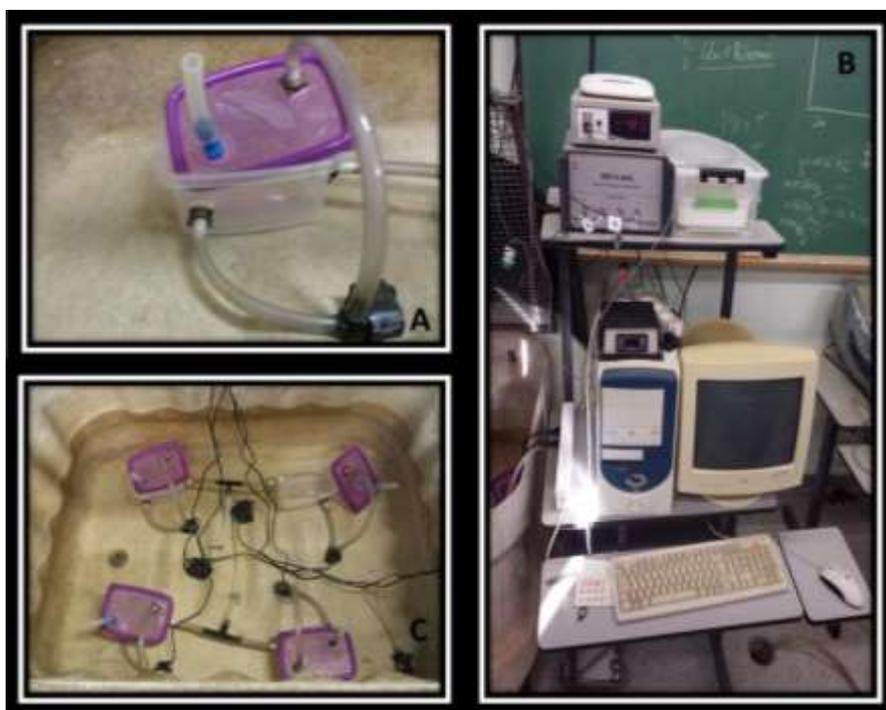
3.2.1. Determinação da taxa metabólica

Para a determinação da taxa metabólica ($\dot{M}O_2$) durante 96 horas em condições normóxicas, utilizou-se 4 grupos experimentais: grupo controle ($n = 8$), grupo exposto a $0,13 \mu\text{g}$ de triclosan/L ($n = 8$) e grupo exposto a $1,3 \mu\text{g}$ de triclosan/L ($n = 8$) e $13 \mu\text{g}$ de triclosan/L ($n = 8$). A adição de triclosan nas concentrações acima citadas foram feitas diretamente na água do tanque experimental. A cada 24h, 50% da água do tanque experimental era renovada, sendo substituída por água com a concentração pré-determinada de TCS ($0,13$, $1,3$ ou $13 \mu\text{g}$), totalizando três renovações (24, 48 e 72 horas de experimento).

Os experimentos foram conduzidos utilizando-se quatro respiômetros de cada vez, sendo que três continham peixes e um deles somente água, para medidas de concentração total de O_2 (Figura 11).

Para todos os grupos experimentais, a $\dot{M}O_2$ foi monitorada por 96h em condições normóxicas e temperatura constante ($26 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$).

Figura 11: Respirometria Fechada de Fluxo Intermitente



A: Respirometro Fechado de Fluxo Intermitente, **B:** Set experimental e **C:** Tanque experimental com 4 respiômetros.

3.2.2. Determinação dos parâmetros cardiorrespiratórios.

As preparações empregadas para a obtenção dos parâmetros cardiorrespiratórios foram baseadas na metodologia utilizada por GLASS et al. (1991) e adaptada por RANTIN et al., (1993).

As cirurgias foram precedidas de um processo de anestesia no qual os peixes foram submetidos a um banho em benzocaína 0,005% por aproximadamente 5 minutos (ou até a cessação da atividade espontânea) e então, transferidos para uma mesa cirúrgica (fig. 12) onde se procedeu a implantação de cateteres de polietileno na porção mediana superior da cavidade bucal (PE 100) e nas partes distais de ambos os cleitros operculares (PE 60) para a obtenção de amostras da água inspirada e expirada, bem como a determinação da frequência respiratória (f_R).

Para a obtenção do ECG e análise da frequência cardíaca (f_H), foram inseridos dois eletrodos de aço inoxidável: o positivo, posicionado ventralmente entre as brânquias e o coração; o negativo foi colocado em posição ventro-caudal próximo às nadadeiras pélvicas, ambos colados com super cola (a base de Cianoacrilato com bico dosador), e o eletrodo neutro colocado na água do tanque experimental. Posteriormente, foram suturados com pontos cirúrgicos na musculatura corpórea (linha de sutura de material nylon composição de poliamidas) afim de evitar seu deslocamento (Figura 12).

Após as cirurgias, os peixes foram transferidos, individualmente, para respirômetros fechados de fluxo intermitente e os experimentos tinham início após 12 hs nessas condições, para a recuperação do estresse causado pelas manipulações.

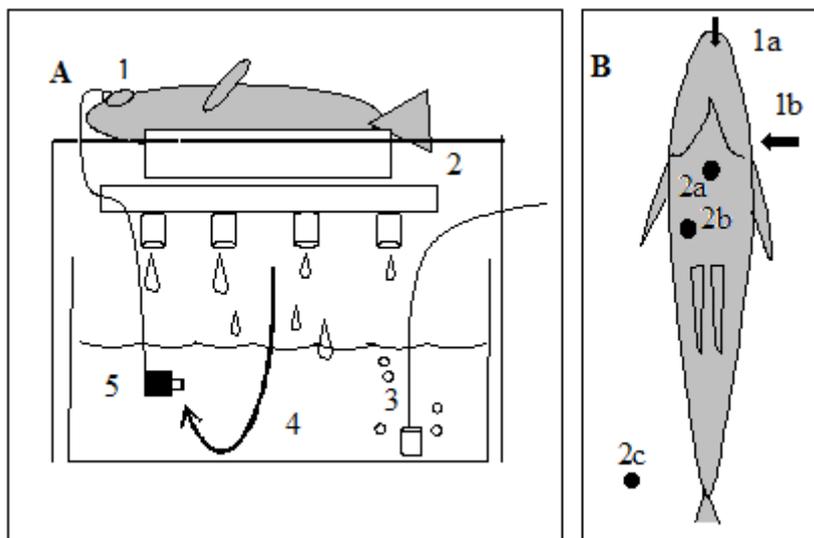
As tensões de O_2 (mmHg) da água de entrada ($P_{in}O_2$ - mmHg) e de saída ($P_{out}O_2$ - mmHg) do respirômetro, bem como as tensões de O_2 da água inspirada (P_iO_2 - mmHg) e expirada (P_eO_2 - mmHg) pelos peixes foram continuamente monitoradas, conectando-se os cateteres de polietileno a um sistema acopladas a sondas de fibra ótica (Presense[®]) (figuras 13 e 14).

A frequência respiratória (f_R) foi determinada através da contagem do número de ciclos respiratórios por minuto, obtidos a partir da cânula implantada na boca do animal, conectada a um transdutor de pressão MLT0380/D que enviam o sinal para um sistema computadorizado de aquisição de dados (ADInstruments-Powerlab[®]).

Para a determinação da frequência cardíaca, os eletrodos acima descritos foram conectados ao amplificador e este, por sua vez, ao sistema computadorizado de aquisição de

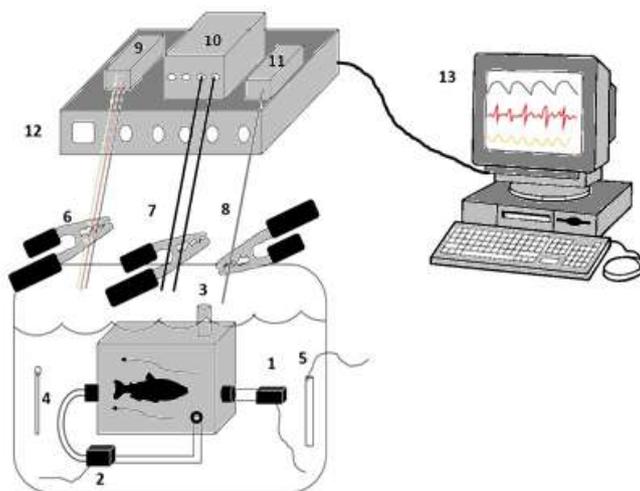
dados (ADInstruments - PowerLab). Esta preparação permitiu que fossem obtidos registros similares àqueles observados na derivação DI da eletrocardiografia padrão.

Figura 12: Preparação dos peixes para os experimentos



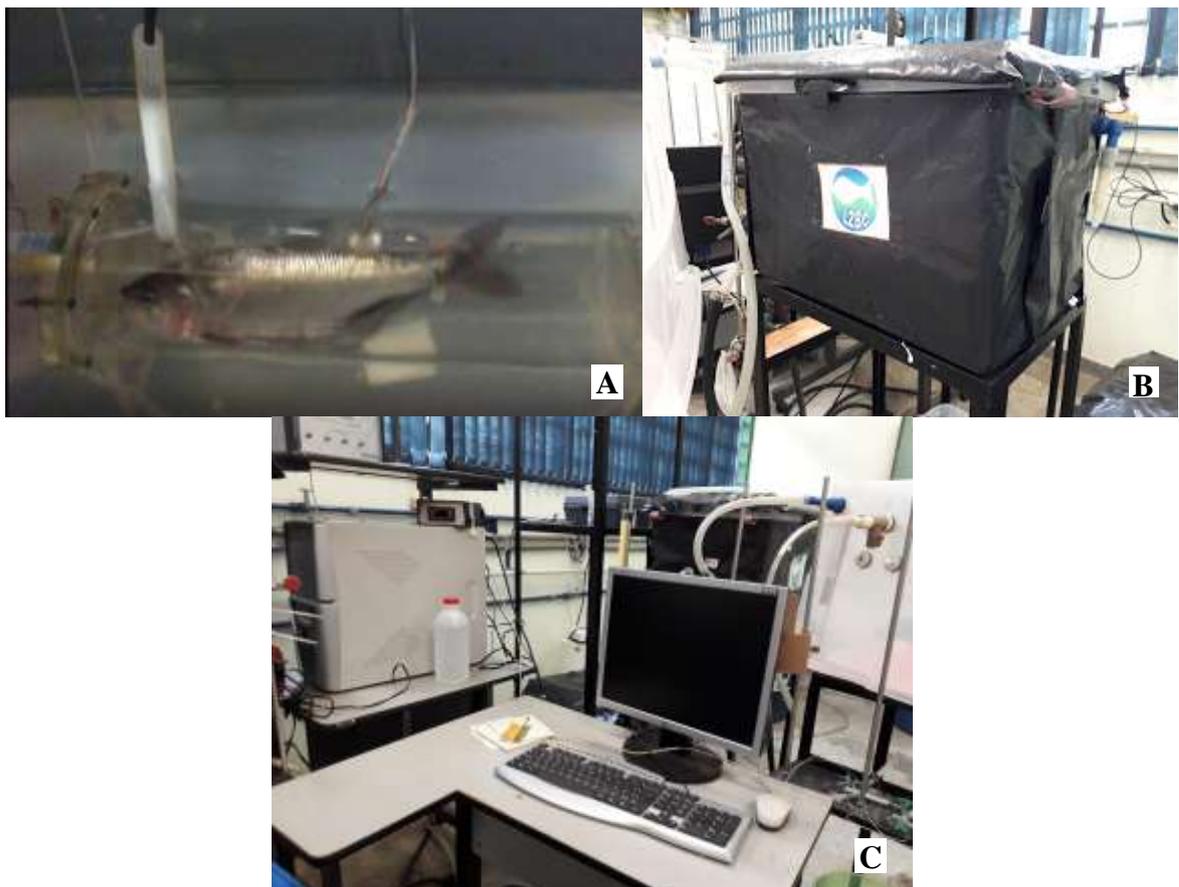
A: (1) o peixe é colocado ventralmente sobre um suporte e é ventilado com água contendo benzocaína por meio de uma mangueira de látex inserida na boca; (2) suporte coletor de água para retorno ao tanque; (3) pedra de aerção; (4) solução anestésica e (5) bomba de recirculação que realiza ventilação do animal - a flecha indica o sentido da recirculação do anestésico. **B:** (1a) implatação de cânula da boca (seta) para mensurar a f_R ; (1b) implatação de cânula na cavidade opercular para medidas de quantidade de O_2 e o cálculo da ventilação branquial. (2) eletrodos para aferições do eletrocardiograma (ECG) sendo um positivo (2a) e um negativo (2b) implantados ventralmente no corpo do peixe e o eletrodo neutro (2c) colocado na água da câmara experimental. **C:** Foto da mesa cirúrgica.

Figura 13: Respirômetro fechado de fluxo intermitente



1- Bomba de renovação de oxigênio (Flush); 2- Bomba de Recirculação contínua de água; 3-Tubo de saída de água do respirômetro; 4- Termômetro; 5- Aquecedor da água; 6- Eletrodos de ECG; 7-Sondas de Oxigênio; 8- Cânula para medidas de pressão bucal; 9- Amplificador de ECG; 10- Analisador de Oxigênio; 11- Transdutor de Pressão; 12- Sistema de aquisição de dados (PowerLab); 13- Computador.

Figura 14: Set experimental de respirometria de fluxo fechado intermitente



A: *Brycon amazonicus* no respirometro; **B:** Tanque experimental onde o respirômetro é inserido; **C:** Sistema computadorizado de aquisição de dados acoplado ao tanque experimental.

Para a análise dos parâmetros cardiorrespiratórios, foram utilizados dois grupos experimentais: o grupo controle (Ctrl - n = 8) e o grupo exposto a 1,3 µg de triclosan por litro de água (TCS - n = 8). Ambos os grupos permaneceram no tanque experimental por 12 h após as quais as medidas dos parâmetros cardiorrespiratórios eram realizadas.

A determinação dos parâmetros cardiorespiratórios do grupo Ctrl foi feita em normóxia (140 mmHg) e nas seguintes tensões de O₂ hipóxicas: 120, 100, 80, 60, 40, 20 e 10 mmHg, obtidas borbulhando-se, por meio de um dispersor (pedra de aeração), quantidades controladas de N₂ e ar comprimido no interior da câmara experimental. Já no grupo TCS, a tensão normóxica não pode ser atingida e os registros dos parâmetros cardiorrespiratórios foram obtidos nas tensões de O₂ hipóxicas de 120, 100, 80, 60, 40, 20 e 10 mmHg.

A temperatura experimental foi mantida constante (26 ± 1 °C). Após a estabilização, cada tensão de O₂ foi mantida por um período de 30 minutos antes de serem efetuadas as medidas e registros dos parâmetros acima citados. Os procedimentos de tomada de medidas e registros foram efetuados, em média, dentro de 5 minutos.

3.2.3 Fundamentos Matemáticos para Respirometria Fechada de Fluxo Intermitente

A tomada de O₂ total ($\dot{M}O_2$) em cada uma das tensões de O₂ experimentais foi determinada utilizando-se o sistema de respirometria fechado (fluxo intermitente), pelo monitoramento das tensões de O₂ da água de entrada ($P_{in}O_2$) e de saída ($P_{out}O_2$) do respirômetro. A $\dot{M}O_2$ foi calculada por meio da equação expressa em mmol.O₂.kg⁻¹.h⁻¹ no que segue abaixo.

$$\dot{M}O_2 = s V_{resp} \alpha_{O_2} m^{-1}$$

Para calcular a $\dot{M}O_2$ aplicamos uma série de tempo de aproximadamente 5 minutos de renovação e 5 minutos de tomadas de valores. A taxa de declínio, o “*slope*” é a tangencial ($s = \Delta O_{2sat} \Delta t^{-1}$) e todos os métodos foram utilizados ajuste da gaussiana dupla calculada por meio da equação proposta por SCHURMANN e STEFFENSEN (1997) e SNYDER et al., (2016), sendo o V_{resp} o volume do respirômetro, α_{O_2} o valor da concentração de oxigênio na água e m o peso fresco do animal (kg).

Utilizou-se regressão linear para o cálculo dos coeficientes angulares a_1 (boca) e a_2 (opérculo), que neste caso representam o declive da reta $y = ax + b$. Utilizamos a regressão

linear sendo $a = \Delta y / \Delta x$, onde o intervalo y representa a % de saturação de O_2 e x o intervalo de tempo.

O coeficiente de determinação (r^2) denota a qualidade do ajuste dos dados à regressão linear, ou seja, representa quão linear são os dados. A equação utilizada para o cálculo de r encontra-se abaixo:

$$r = \frac{\sum(x - \bar{x})(y - \bar{y})}{\sqrt{\sum(x - \bar{x})^2 \sum(y - \bar{y})^2}}$$

Ao obter r , basta elevá-lo ao quadrado para encontrar o coeficiente de determinação. Para o cálculo do coeficiente angular considerou-se somente os dados em que $r^2 > 0,9$ (STEFFENSEN, 2015- User's Guide Aquaresp).

As medidas de concentração de O_2 na água utilizando as 3 metodologias descritas anteriormente mostraram que o triclosan causa uma diminuição na solubilidade de oxigênio na água (o que será apropriadamente discutido posteriormente), evidenciada tanto utilizando-se analisadores de fibra ótica quanto eletrodos galvânicos ou o Método Winkler. Portanto, para as medidas de consumo de oxigênio do grupo exposto foi mantido um respirômetro sem peixe com o fim de descontar a diminuição da solubilidade de oxigênio na água ocasionada pela degradação química do TCS durante o experimento.

Com o intuito de obter o consumo efetivo de oxigênio do grupo exposto, a tomada do consumo de TCS foi subtraída das tomadas do consumo de oxigênio do animal ($\text{mmol.O}_2.\text{s}^{-1}$), obtendo-se os valores corrigidos representados por $RO_{2\text{corr}}$ (SVENDSEN et al., 2016).

$$RO_{2\text{corr}} = RO_{2\text{animal}} - RO_{2\text{TCS}}$$

Para medir a ventilação branquial (o fluxo que passa pelas brânquias para renovação da água que banha as lamelas secundárias) de peixes teleosteos pode-se utilizar a medida indireta baseada na Princípio de Fick (HUGHES; SUNDERS, 1970). A ventilação branquial pode ser medida canulando-se a câmara opercular do animal com catéteres de polietileno que levam amostras de água dessas cavidades até um tubo plástico que abriga uma sonda de led com fibra ótica conectada a um analisador de O_2 verificando o início das tomadas (P_{inO_2}) e expirada (P_{iO_2}) pelo opérculo dos peixes em cada uma das tensões de O_2 experimentais.

$$\dot{V}_G = (P_{inO_2} - P_{iO_2}) \cdot \alpha_{O_2} \dot{M}O_2^{-1}$$

O volume ventilatório, ou volume corrente (\dot{V}_T) em cada uma das tensões de O_2 experimentais foi calculado pelo quociente entre a ventilação branquial (\dot{V}_G) e a respectiva frequência respiratória (f_R) e expresso em $\text{mlH}_2\text{O.Kg}^{-1}.\text{ciclo respiratório}^{-1}$.

A necessidade ventilatória ($\dot{V}_G/\dot{M}O_2$), em cada uma das tensões de O_2 experimentais foi calculada pelo quociente entre a ventilação branquial (\dot{V}_G) e o respectivo valor de tomada de O_2 ($\dot{M}O_2$) e expressa em $\text{mlH}_2\text{O.mlO}_2^{-1}$.

A tensão crítica de oxigênio foi calculada individualmente para cada indivíduo e foi realizado uma média de todos os valores.

3.2.4 Western blotting

Após os experimentos acima descritos, os peixes dos grupos controle e expostos à $1,3 \mu\text{g.L}^{-1}$ de triclosan foram eutanasiados por concussão craniana, seguida por secção vertebral. Logo após, procedeu-se à excisão do coração para coleta e pesagem de amostras do ventrículo. Estas foram congeladas em nitrogênio líquido, sendo transferidos para estocagem num ultra freezer a -80°C .

3.2.4.1. Homogeneização do músculo cardíaco

Para realização desta etapa, o tecido ventricular foi preparado sendo macerado e diluído em tampão hiperosmótico (sacarose 250 mM, tris 50 mM, EDTA 1 mM pH 7,4) num eppendorf e em seguida, a amostra foi homogeneizada com auxílio de um homogeneizador (IKA® T10 basic, Homogeneizer workcenter).

A mistura obtida foi então centrifugada inicialmente sob velocidade de 10.000 rpm por 40 min a 4°C . Para realizar a centrifugação das amostras, estas foram balanceadas completando os eppendorf com tampão hiperósmico quando necessário. O sobrenadante obtido desta etapa foi coletado e transferido para novos eppendorf, sujeitos a uma segunda centrifugação. Para tanto, utilizou-se uma ultra-centrífuga (Ultra centrífuga, Beckman coulter optima XE-90 ultracentrifuge) sob velocidade 100.000 rpm durante 1h a 4°C . Nesta descartou-se o sobrenadante e coletou-se o pellet obtido e sendo este resuspendido com adição de solução tampão (100 a 150 μL) e com auxílio de Vortex. A amostra resultante foi armazenada em ultra-freezer a -80°C .

3.2.4.2. *Quantificação de proteínas*

O procedimento foi realizado de acordo com o método Bradford (1976), valendo-se do kit para medida de proteínas da Bio-Rad®. O método em si compreende a adição de um corante ácido numa solução de proteínas e mensuração da intensidade da reação na amostra com auxílio de um espectrofotômetro, avaliando num comprimento de onda de 595 nm. As amostras foram ainda diluídas em tampão Tris-EDTA (1µl amostra e 29µl tampão tris-ETDA).

O corante utilizado foi o reagente de Bradford. Este foi adicionado por último aos poços da placa de ELISA, e conservado em um ambiente escuro por um intervalo de 5 minutos, sendo em seguida realizado a leitura no espectrofotômetro.

A quantificação das proteínas se baseia na comparação do resultado obtido na leitura das amostras com uma curva padrão, servindo essa como referência. A curva foi obtida por meio de uma placa Elisa, na qual se estabelece uma escala gradual de concentrações conhecidas de uma proteína referencial com corante. A intensidade da coloração azulada acompanha o aumento gradativo da concentração de proteína.

3.2.4.3. *Eletroforese*

Para realização da primeira etapa da eletroforese, utilizou-se de géis que foram confeccionados previamente (VASCONCELOS, 2014). Estes se dividem em 2 tipos, gel de empilhamento e gel de corrida (Tabela 5). O propósito do gel empilhamento reside na concentração da amostra da proteína numa banda de modo que, apesar de terem massas diferentes, as proteínas migrem a partir de um mesmo nível. Já o gel de corrida corresponde aquele ao longo do qual ocorre a migração e separação das proteínas, sob estímulo elétrico.

Os géis, ambos de poliacrilamida, compartilham os mesmos componentes, diferindo no tampão Tris a ser utilizado e na concentração de cada componente na confecção destas. Na preparação do gel de empilhamento foram empregados pentes com espessura de 1,5 mm para formação de poços de modo que fosse possível a deposição de amostras de até 20 µL nos poços formados.

A quantificação das proteínas foi realizada utilizando-se a placa Elisa e uma escala gradual de concentrações de proteínas, para a construção de uma curva padrão, utilizada como referência para a quantificação das amostras. Foi utilizada uma solução de albumina do soro bovino (BSA-bovine sérum albumin), na concentração conhecida de 1mg.ml⁻¹. A BSA foi adicionada em quantidades crescentes nos poços da placa Elisa (0, 2, 4, 6, 8 e 10 µL), sendo

completados para 10 μ L com tampão Tris-EDTA. A cada poço foi acrescentado 200 μ L do reagente de Bradford para reação com as proteínas e posterior leitura do espectrofotômetro.

O gel foi depositado entre as lâminas de vidro do kit Mini-Protean (Bio-Rad) e deixado para polimerizar durante 30 minutos.

Tabela 5: Composição do gel de Corrida 10% e Empilhamento com os respectivos volumes

Componentes	Gel Corrida	Gel empilhamento
Água	1,9 ml	0,68 ml
Bisacrilamida 30	1,7 ml	330 μ l
Tampão tris pH 8,8	1,3 ml	-
Tampão tris pH 6,8	-	130 μ l
SDS 10	50 μ l	10 μ l
PSA	50 μ l	10 μ l
Tween	2 μ l	1 μ l

Após o preparo, o gel de corrida foi posicionado entre lâminas de vidro do kit Mini-Protean (Bio-Rad) para o processo de polimerização durante um período de 30 minutos. Decorrido esse intervalo, sobre este, e entre lâminas de vidro, dispôs-se um preparo de gel de empilhamento com o pente anexado. Posteriormente à polimerização do gel de empilhamento, com o pente retirado, o complexo gel-lâminas foi transferido para a cuba de eletroforese a qual se acrescentou tampão de corrida (sacarose 250mM; Tris 50 mM; EDTA 1mM; pH 7,4) até ultrapassar o nível do complexo.

Baseando-se nos resultados obtidos na quantificação de proteínas das amostras, os volumes a serem pipetados em cada poço foram determinados. A quantidade de amostra a ser utilizada foi calculada de modo que o volume contivesse 100 μ g de proteína.

Previamente à pipetagem nos poços, as amostras foram colocadas em microtubos aos quais acrescentou-se tampão de Laemli (Sigma®) num volume equivalente ao da amostra.

Seguidamente estes foram aquecidos a 100°C durante 5 minutos, sendo então centrifugados a 11.000 rpm por um mesmo intervalo de tempo.

Para referencial da corrida das amostras, adicionou-se um marcador de massa molecular (Precision Plus Protein Prestained Standards, Dual Color – Bio-Rad®) a um dos poços. No decorrer da eletroforese, a migração desta pelo gel resulta em bandas coradas, com diferentes massas moleculares (10, 15, 20, 25, 37, 50, 75, 100, 150 e 250 kDa).

Após o processo anterior, completou-se o volume da cuba com tampão de corrida (Tris 3g; Glicina 14,4 g; SDS 10% 10 mL; água destilada q.s.p 1L) conectando-se os eletrodos à fonte. A corrida ocorreu sob voltagem constante de 100 volts durante 2h, em temperatura ambiente.

3.2.4.4. Transferência

As proteínas separadas ao longo do gel pela eletroforese vertical foram transferidas por eletroforese para membranas de fluoterto de polividileno (PVDF), com dimensões 5,5 x 8 cm. Antes da transferência, as membranas foram atizadas por 20 segundos em metanol, e posteriormente lavadas com água destilada, permanecendo no tampão de transferência (Tris 3,08g; Glicina 14,26 g; Metanol 20%, SDS 0,05%; água destilada q.s.p. 1L) por mais 20 minutos. A membrana, por sua vez, é ativada em metanol por 20 segundos, sendo então transferidos para banho com tampão de transferência.

Com o sistema acima descrito montado, procedeu-se à acomodação do mesmo na cuba de eletroforese adicionando o tampão de transferência (Tris 3,08 g; Glicina 14,26 g; Metanol 20%; SDS 0,05%; água destilada q.s.p. 1L) procurando manter refrigeração constante de ~4 °C. Esta etapa de eletroforese teve a duração de 2h, sob uma voltagem de 100 V. O gel de empilhamento foi descartado.

3.2.4.5. Incubação com anticorpos

Concluída a transferência, a membrana obtida foi depositada num recipiente contendo solução bloqueadora (1 g de leite em pó desnatado diluídos em 20 ml tampão lavagem) e mantida em agitador do tipo gangorra por 90 minutos a temperatura ambiente (VASCONCELOS, 2014).

Decorrida esta etapa procedeu-se a incubação com solução contendo anticorpo. Para cada uma das proteínas utilizaram-se 2 anticorpos, um primário específico para a proteína de interesse, e um secundário que se ligará ao primário. O anticorpo primário foi diluído em

solução bloqueadora e acrescentado a um recipiente contendo a membrana. A incubação primária ocorreu sob refrigeração constante (4°C em refrigerador), overnight sob agitação constante em gangorra. Após a incubação primária, as membranas foram lavadas com 20 ml de tampão de lavagem afim de retirar possíveis excessos durante 30 min, renovando o tampão em intervalos de 10 min. Para a segunda incubação, adicionou-se a um recipiente com as membranas uma solução com anticorpo secundário específico diluído em solução bloqueadora. Esta incubação ocorreu a temperatura ambiente por um período de 2 horas.

Para o NCX, utilizou-se o anticorpo primário anti-NCX1 (Santa Cruz Biotechnology, U.S.A., sc-32881) isolado de coelho, e o anticorpo secundário anti-coelho IgG-AP (Santa Cruz Biotechnology, U.S.A., sc-2034) de origem caprina. As respectivas concentrações foram 50 µl em 20 ml e 10 µl em 20 ml em solução bloqueadora. Para o estudo dos Canais do tipo L, utilizou-se o anticorpo primário L-type Ca²⁺CP α1C (D-6) (Santa Cruz Biotechnology, U.S.A sc-398433), um anticorpo monoclonal de camundongo, e o anticorpo secundário foi de origem caprina anti-camundongo (Upstate Chemicon, U.S.A., Código AP308A) conjugado com fosfatase alcalina. As respectivas concentrações utilizadas correspondem a 50 µl em 20 ml de solução bloqueadora e 10 µl em 20 ml de solução bloqueadora.

3.2.4.5. Revelação das membranas

Finalizado o processo de incubação, as membranas foram então lavadas com tampão de lavagem durante 30 minutos, renovando-se este em intervalos de 10 minutos, sendo logo após lavadas com água destilada.

Efetou-se a etapa da revelação das membranas e identificação da expressão das proteínas com o sistema revelador Alkaline Phosphatase Conjugate Substrate Kit (Bio-Rad®). As membranas eram colocadas em um recipiente vedado com papel opaco ao qual adicionava-se solução reveladora e colocadas sob agitação contínua por 1 a 2 minutos, sendo depois enxaguadas com água destilada e dispostas para secar.

As membranas com as bandas reveladas foram fotografadas com auxílio de um fotodocumentador e posteriormente analisadas digitalmente com auxílio do software ImageJ (ABRAMOFF et al.,2014). para analisar a concentração de proteínas.

3.2.4.6. Cálculos Utilizados

Para o cálculo da massa ventricular relativa (MVR), realizou-se a divisão da massa ventricular pela massa corporal respectiva do espécime. A média da MVR dos grupos foi calculada e os valores comparados entre os grupos.

Para análise dos níveis de expressão da proteína, realizou-se a normalização dos valores com valores da expressão de Gliceraldeído trifosfato desidrogenase (GAPDH), um endógeno de referência. Para tal calculou-se a razão entre os valores obtidos de densidade óptica das bandas obtidas de cada grupo com os respectivos valores de GAPDH, sendo o resultado expresso em unidades arbitrárias de densidade óptica (U. A.).

3.3. Tratamento Estatístico dos Resultados

Para as análises estatísticas utilizou-se o software GraphPad InStat v.3.0 (GraphPad Software Inc., USA).

3.3.1. Parâmetros cardiorrespiratórios *in vivo*

Os resultados foram expressos em média \pm E.P.M (erro padrão da média).

Os seguintes procedimentos estatísticos foram adotados para a análise dos dados obtidos no presente estudo: ANOVA one-way para as múltiplas comparações e o teste de Tukey-Kramer para aferir possíveis variações significativas entre os valores obtidos nas diferentes tensões de oxigênio.

Para o mesmo grupo experimental foi realizado o teste de Wilcoxon-Mann-Whitney para verificar a ocorrência de possíveis diferenças significativas entre os pontos correspondentes dos dois grupos experimentais.

Somente diferenças estatísticas ao nível de 5% de significância foram consideradas ($P < 0,05$).

3.3.2. Western Blotting

Os valores obtidos nas análises foram expressos como médias \pm E.P (erro padrão).

Para comparação da expressão das proteínas e massa ventricular relativa entre os diferentes grupos, controle e exposto, foi utilizado o Teste T de Student não-pareado. Considerou-se a ocorrência de diferença significativa entre expressão de proteínas dos grupos circunstâncias na qual o valor de $P < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Respostas cardiorrespiratórias in vivo.

O método de medidas de O₂ dissolvido na água por meio de sensores de fibra ótica mostrou-se mais sensível e com maior acuracidade, sendo adotado para a realização dos demais experimentos.

A figura 15 apresenta os valores médios de tensão de oxigênio da água controle (Ctrl) e após adição de 1,3 µg.L⁻¹ de triclosan, obtidos por meio de três métodos distintos: eletrodo de fibra ótica, eletrodo galvânico e pelo método de Winkler ao longo de 12 h de registro. As seguintes PO₂ da água foram registradas na água controle: 139.0 ± 0.1 mmHg, 135.0 ± 0.9 mmHg e 145.4 ± 0.6 mmHg para as medidas óticas, galvânicas e Winkler, respectivamente. Após adição de TCS, os seguintes valores de PO₂ foram registrados ao longo de 12h: 121.8 ± 1.6 mmHg, 95.8 ± 4.7 mmHg e 120.8 ± 1.6 mmHg para as medidas óticas, galvânicas e Winkler, respectivamente, mostrando que o triclosan impede a saturação total da água com O₂.

Não foram observadas diferenças significativas entre os resultados obtidos por meio dos diferentes métodos e, então, optou-se pela realização das demais medidas de concentração de O₂ utilizando-se o eletrodo de fibra ótica.

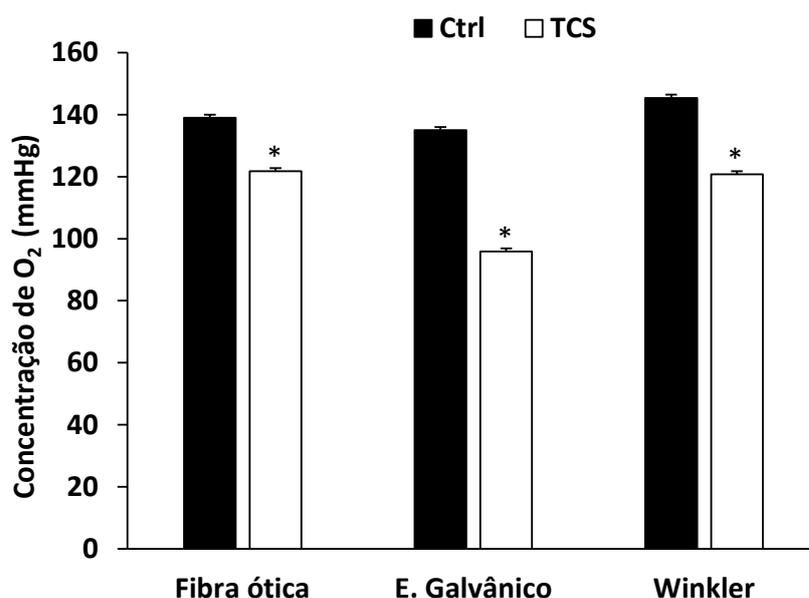
A análise dos valores de PO₂ descritos acima revelou que, surpreendentemente, a água não se satura 100% com O₂ em presença de TCS. A redução na concentração de O₂ da água em presença de TCS implicou na impossibilidade de registro dos parâmetros cardiorrespiratórios do grupo TCS em normóxia (100% de O₂ ou ~ 140 mmHg) e na adaptação do método de registro do consumo de O₂ desse grupo. Durante os experimentos, um respirômetro sem peixe foi mantido no interior do tanque experimental e os valores de O₂ em seu interior foram medidos concomitantemente aos aferidos para os respirômetros contendo os peixes. A tomada de O₂ dos peixes do grupo TCS foi obtida descontando-se o valor de concentração de O₂ do respirômetro vazio.

A taxa metabólica ($\dot{M}O_2$) de matrinxã durante 96 h em normóxia sob condições controle e em três concentrações de triclosan (0,13; 1,3 e 13 µg.L⁻¹) é apresentado na figura 16.

O grupo controle, nas 96 horas, apresentou valores médios de $\dot{M}O_2$ de 3,56 mmol.Kg⁻¹.h⁻¹, valores semelhantes (P > 0,05) aos apresentados pelo grupo exposto ao TCS na concentração de 0,13 µg.L⁻¹ ($\dot{M}O_2$ = 3,61 mmol.Kg⁻¹.h⁻¹). O grupo exposto de 1,3 µg.L⁻¹ de TCS

apresentou $\dot{M}O_2$ média de $2,50 \text{ mmol.Kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$, valor este que não diferiu significativamente ($P > 0,05$) do obtido para o grupo exposto a $13 \mu\text{g.L}^{-1}$, de $2,03 \text{ mmol.Kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Os valores de $\dot{M}O_2$ dos grupos expostos a $1,3$ e $13 \mu\text{g.L}^{-1}$ de TCS foram significativamente inferiores aos obtidos para os grupos controle e exposto a $0,13 \mu\text{g.L}^{-1}$. Desta forma, os experimentos posteriores foram conduzidos utilizando-se a menor concentração de triclosan na qual foi observada alteração significativa na $\dot{M}O_2$, ou seja, na concentração de $1,3 \mu\text{g.L}^{-1}$.

Figura 15: Valores médios (12 h) de concentração de O_2 na água por diferentes técnicas



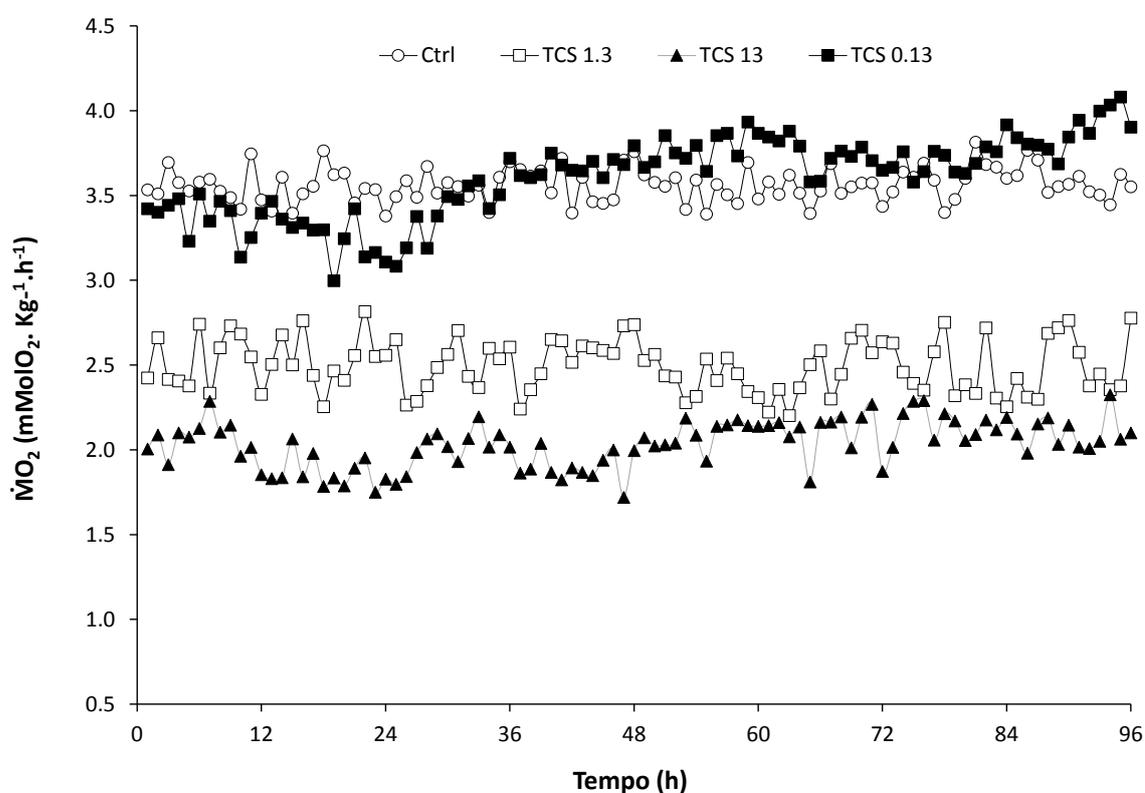
* representa diferença significativa entre grupos controle (Ctrl) e triclosan (TCS).

Os valores de taxa metabólica de rotina ($\dot{M}O_2 - \text{mmolO}_2.\text{kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$) de *B. amazonicus* do grupo controle em normóxia e durante hipóxia gradual são apresentados na tabela 6 e representados graficamente nas figuras 17, 18 e 19. A $\dot{M}O_2$ mostrou-se independente da concentração de O_2 no meio, característica de uma espécie oxirreguladora capaz de manter a $\dot{M}O_2$ constante, em torno de $3.35 \text{ mmolO}_2.\text{kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$, de normóxia até a tensão de O_2 na água de aproximadamente 40 mmHg. Nas $P_{in}O_2$ inferiores, a espécie não foi capaz de manter a $\dot{M}O_2$ constante, tornando-se dependente da PO_2 da água.

Os valores de $\dot{M}O_2$ do grupo TCS ($1,3 \mu\text{g.L}^{-1}$) foram significativamente inferiores (~20%) aos do grupo Ctrl, com valores médios de $2.70 \pm 0.04 \text{ mmolO}_2.\text{kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$ nas tensões de O_2 entre 120 e 60 mmHg. A exposição ao Triclosan aumentou significativamente a P_cO_2 de *B.*

amazonicus para ~56 mmHg e caracterizando um aumento de aproximadamente de 40%. Comparando o exposto em relação ao controle houve diferença significativa em todas as tensões analisadas. O teste não paramétrico de Mann-Whitney indicou que houve diferença significativa entre o controle e o TCS nos valores de 1,3 µg/L e considerando o nível de significância de 5%.

Figura 16: Valores médios da taxa metabólica ($\dot{M}O_2$) de matrinxã, *Brycon amazonicus*, controle e expostos ao triclosan durante 96 h



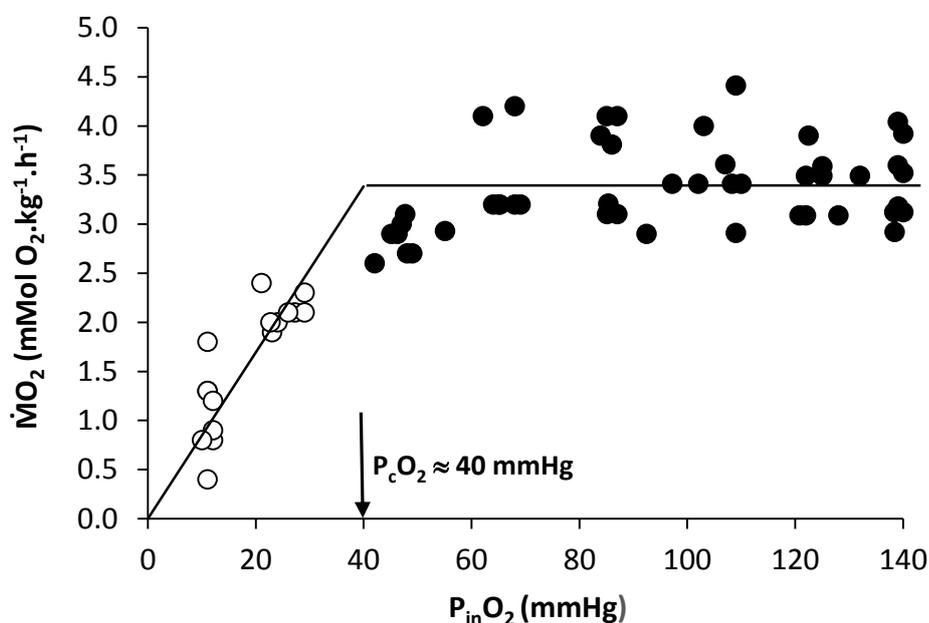
Ctrl: Grupo controle-(○); grupo TCS 0,13 µg.L⁻¹ (■), grupo TCS 1,3 µg.L⁻¹-(□) e grupo TCS 13 µg.L⁻¹-(▲). N = 8 para todos os grupos experimentais.

Tabela 6: Valores médios da taxa metabólica ($\dot{M}O_2$) de *B. amazonicus* dos grupos controle (CTRL - n = 8) e exposto ao triclosan (TCS - n = 8) em normóxia e hipóxia gradual.

P_{iO_2} (mmHg)	$\dot{M}O_2$ (mmolO ₂ .Kg ⁻¹ .h ⁻¹)	
	CTRL	TCS
140	3,4 ± 0,1	-
120	3,4 ± 0,1	2,6 ± 0,1 *
100	3,6 ± 0,2	2,6 ± 0,1 *
80	3,5 ± 0,2	2,7 ± 0,1 *
60	3,4 ± 0,2	2,7 ± 0,1 *
40	2,8 ± 0,1	2,0 ± 0,1 *
20	2,1 ± 0,1	1,0 ± 0,1 *
10	1,1 ± 0,2	0,6 ± 0,1 *

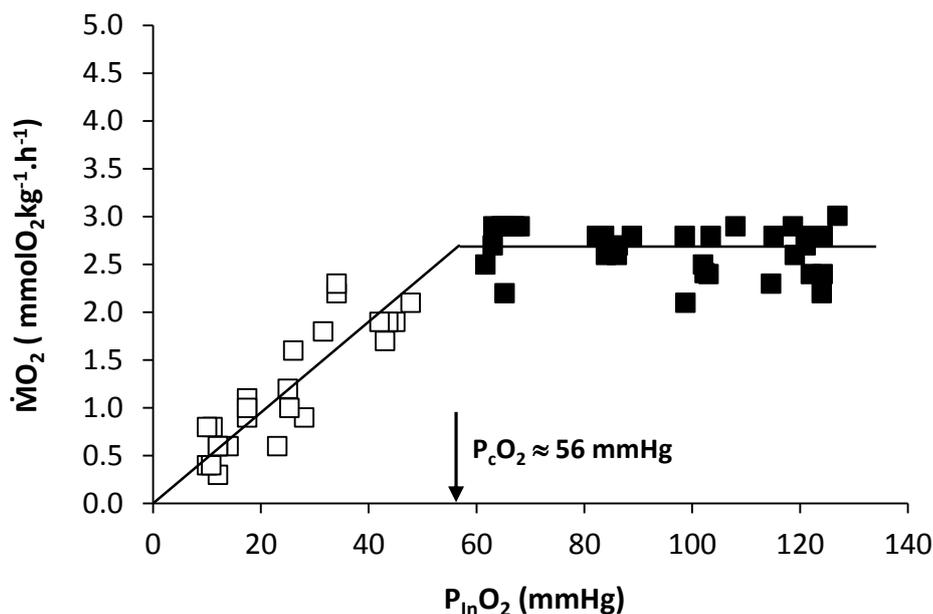
Médias ± EPM. Valor em negrito - indica diferença significativa em relação aos valores iniciais de normóxia; * indica diferença significativa entre os grupos experimentais (P < 0,05).

Figura 17: Consumo de oxigênio de *B. amazonicus* do grupo controle em normóxia e hipóxia gradual



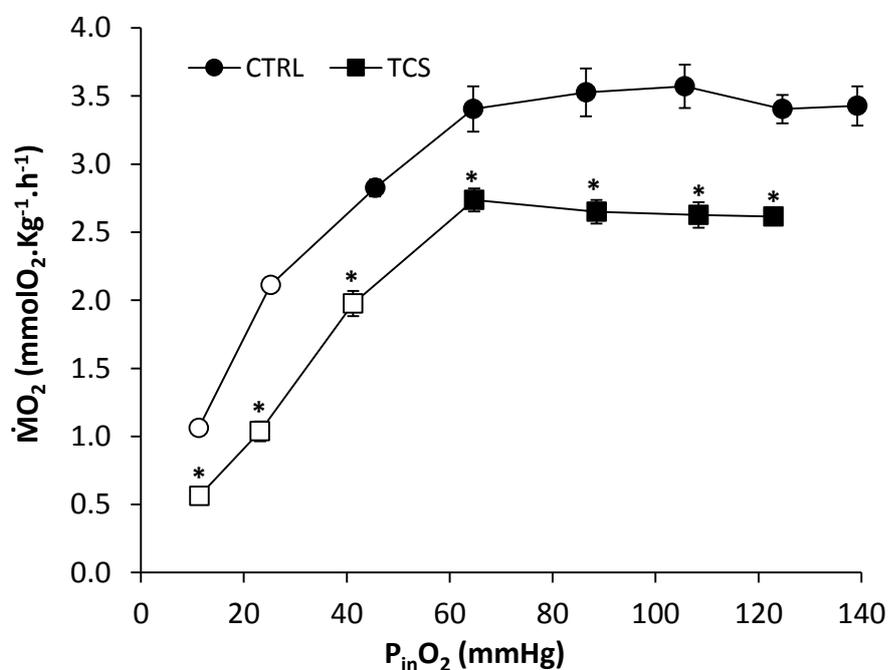
$\dot{M}O_2$ – consumo de oxigênio (mmolO₂.kg⁻¹.h⁻¹); $P_{c}O_2$ – tensão crítica de oxigênio (mmHg). Valores médios ± E.P.M. (n = 8). Símbolos brancos indicam diferenças significativas em relação aos valores normóxicos (p < 0,05).

FIGURA 18: Efeito da redução gradual das tensões de oxigênio da água de entrada do respirômetro (P_{iO_2} – mmHg)



$\dot{M}O_2$ - consumo de O₂ (mmolO₂.kg⁻¹.h⁻¹); P_{cO_2} – tensão crítica de O₂ (mmHg). Valores médios ± E.P.M. (n = 8). Símbolos brancos indicam diferenças significativas em relação aos valores normóxicos (p < 0,05).

FIGURA 19: Taxa metabólica ($\dot{M}O_2$) de matrinxã, *Brycon amazonicus*, em relação às reduções graduais da $P_{in}O_2$ (mmHg)



No grupo controle (Ctrl; n = 8) e no grupo exposto ao Triclosan (TCS, n = 8). Médias ± E.P.M. Símbolos abertos indicam diferença significativa em relação aos valores normóxicos. Asteriscos indicam diferença significativa entre os grupos Ctrl e TCS em uma mesma $P_{in}O_2$.

Os valores médios de ventilação branquial (\dot{V}_G), frequência respiratória (f_R) e volume ventilatório (V_T) de *B. amazonicus* dos grupos controle e exposto ao triclosan em normóxia e hipóxia gradual estão representados na tabela 7 e figura 20.

No grupo controle, a \dot{V}_G obtida em normóxia foi de 589,6 mLH₂O.Kg⁻¹.min⁻¹ e manteve-se constante até 60 mmHg, abaixo da qual, os valores de \dot{V}_G foram significativamente maiores, sendo o valor máximo alcançado em 20 mmHg (1914,1 ± 235,5 mLH₂O.Kg⁻¹.min⁻¹), correspondendo um aumento de 3,2 vezes, sendo que a \dot{V}_G do grupo controle aumentou progressivamente em todas as tensões com diferença significativa em relação a normóxia nas tensões de 40 e 20 mmHg.

No grupo exposto ao TCS, a diminuição da tensão de O₂ na água provocou um aumento da \dot{V}_G a partir de 60 mmHg (1001,1 ± 40,3 mLH₂O.Kg⁻¹.min⁻¹), com diferença significativa em relação ao controle nas tensões 40,20 e 10 mmHg. Os peixes expostos ao TCS apresentaram valores de \dot{V}_G significativamente inferiores aos controles nas tensões de 40, 20 e 10 mmHg.

Tabela 7: Valores médios de ventilação branquial (\dot{V}_G), frequência respiratória (f_R) e volume ventilatório (V_T) de *B. amazonicus* dos grupos controle (CTRL - n = 8) e exposto ao triclosan (TCS - n = 8) em normóxia e hipóxia gradual.

PiO ₂ (mmHg)	\dot{V}_G (mLH ₂ O.Kg ⁻¹ .min ⁻¹)		f_R (respiração.min ⁻¹)		VT (mLH ₂ O.Kg ⁻¹ .h ⁻¹ .Resp.min ⁻¹)	
	CTRL	TCS	CTRL	TCS	CTRL	TCS
140	589,6 ± 29,3	-	86,2 ± 0,7	-	6,59 ± 0,37	-
120	624,4 ± 44,2	407,8 ± 15,3	84,9 ± 0,6	92,9 ± 1,0 *	6,87 ± 0,46	4,39 ± 0,17
100	747,4 ± 60,2	457,8 ± 14	87,0 ± 1,6	94,0 ± 0,7 *	8,04 ± 0,53	4,86 ± 0,13
80	871,2 ± 81,9	562,1 ± 37,5	101,4 ± 2,4	105,0 ± 2,4	8,32 ± 0,96	5,38 ± 0,37
60	1079,7 ± 89,9	1001,1 ± 40,3	105,3 ± 2,4	114,5 ± 1,4 *	10,34 ± 0,64	8,76 ± 0,38
40	1465,7 ± 184,4	908,3 ± 63,1 *	110,2 ± 1,7	108,2 ± 1,8	13,50 ± 1,63	8,36 ± 0,48 *
20	1914,1 ± 235,5	971,5 ± 76,8 *	124,0 ± 1,8	108,8 ± 1,0 *	15,58 ± 1,78	8,93 ± 0,70 *
10	1195,8 ± 78,9	656,1 ± 39,2 *	124,0 ± 1,1	107,3 ± 1,0 *	9,84 ± 0,59	6,13 ± 0,40 *

Médias ± EPM. Valor em negrito - indica diferença significativa em relação aos valores iniciais de normóxia; * indica diferença significativa entre os grupos experimentais (P < 0,05).

A frequência respiratória (f_R) do grupo controle em normóxia foi de 86 a 87 respiração.min⁻¹ e para o grupo exposto ao TCS foi de 92 a 94 respiração.min⁻¹.

Ambos os grupos aumentaram a f_R nas tensões de O₂ de 80, 60, 40, 20 e 10 mmHg em relação a normóxia.

Para ambos os grupos, os maiores valores de f_R ocorreram à 20 mmHg (124,0 ± 1,8 resp.min⁻¹ para o grupo controle e 108,8 resp.min⁻¹ para o grupo TCS), correspondendo a aumentos de ~44% em relação a normóxia para o grupo controle e ~16% para o grupo TCS em relação à 120 mmHg.

Comparando-se os valores de f_R de ambos os grupos experimentais, evidencia-se que os valores da f_R apresentados pelos peixes do grupo exposto ao TCS foram significativamente superiores aos do controle nas tensões 120, 100 e 60 mmHg. Contudo, a f_R do grupo TCS diminuiu nas tensões de 40, 20 e 10 mmHg, o que não ocorreu no grupo controle.

O volume ventilatório- V_T ocorreu uma elevação progressiva nas diferentes tensões do grupo controle com diferença significativa nas tensões de 40 e 20 mmHg em relação a normóxia, e o grupo exposto ao TCS nas tensões de 40, 20 e 10 mmHg em relação a normóxia. A análise de variância two-way indicou que houve interação significativa entre a exposição para o TCS e a hipóxia para a ventilação branquial (\dot{V}_G), f_R e V_T e considerando o nível de significância de 5%.

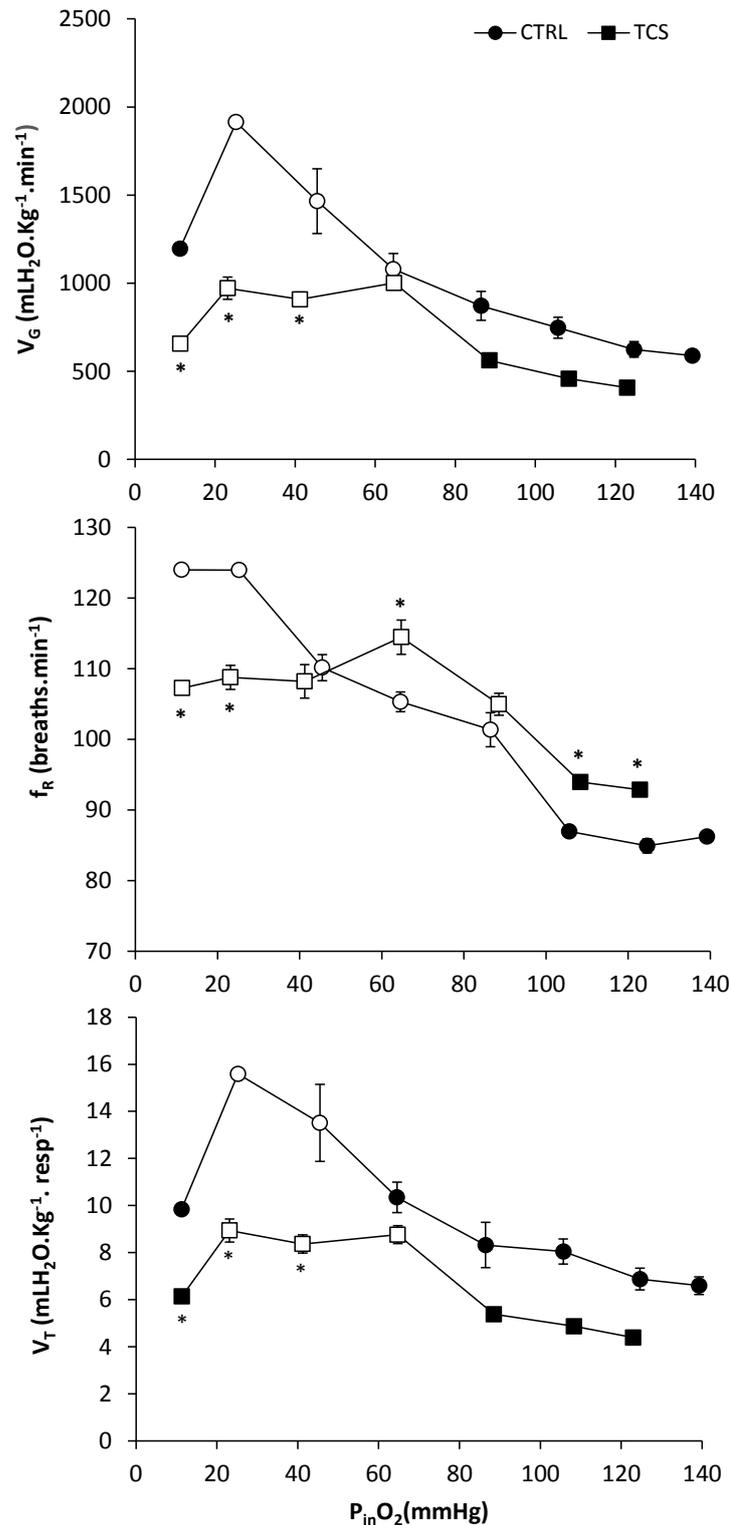
Os valores médios da necessidade ventilatória - $\dot{V}_G/\dot{M}O_2$ (mL.mmol⁻¹) de *B. amazonicus* dos grupos controle e exposto ao triclosan em normóxia e hipóxia gradual estão apresentados na tabela 8 e figura 21.

No grupo controle a $\dot{V}_G/\dot{M}O_2$ foi de 173,23 ± 9,30 mL.mmol⁻¹ apresentaram um aumento significativo, atingindo um valor máximo na tensão de 20 mmHg (902,04 ± 107,98 mL.mmol⁻¹) correspondendo um aumento de aproximadamente de 6 vezes o valor da $\dot{V}_G/\dot{M}O_2$ em relação a normóxia. No grupo TCS a $\dot{V}_G/\dot{M}O_2$ foi de 156,20 ± 3,66 mL.mmol⁻¹ e o maior valor obtido na tensão de 20 e 10 mmHg com valores de 1007,38 ± 119,03 e 1310,15 ± 180 mL.mmol⁻¹

Quando comparados os grupos controles e o exposto ao TCS não foram observadas diferenças significativas nos valores da $\dot{V}_G/\dot{M}O_2$ em nenhuma das tensões de O₂ analisadas.

A análise two-way indicou que os fatores exposição ao TCS com a hipóxia são aditivos com relação a necessidade ventilatória- $\dot{V}_G/\dot{M}O_2$ (mL.mmol⁻¹) considerando o nível de significância de 5%.

Figura 20: Ventilação branquial (\dot{V}_G), frequência respiratória (f_R) e o volume ventilatório (V_T) de *B. amazonicus* dos grupos controle e exposto ao TCS



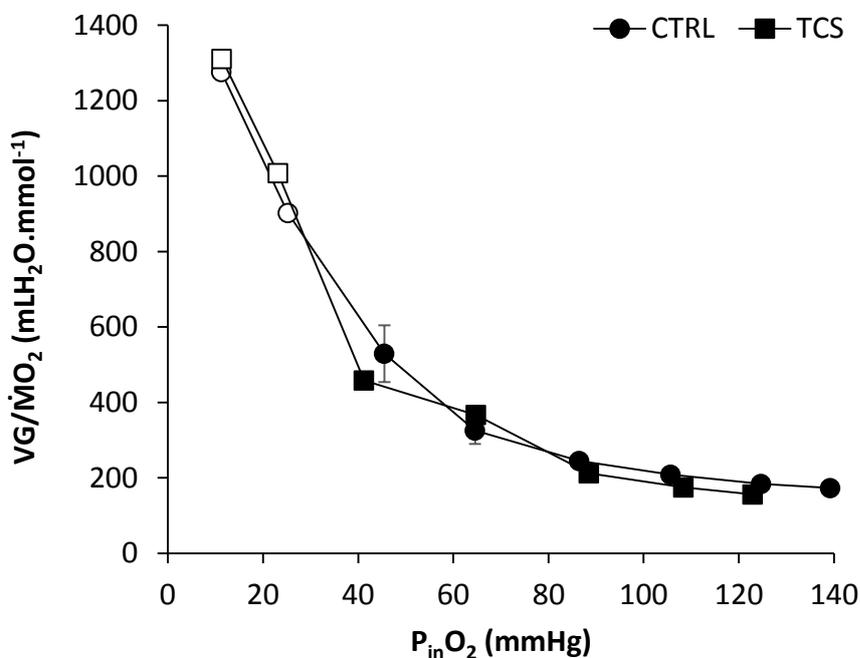
As tensões de O₂ da água inspirada ($P_{in}O_2$) dos grupos controle (Ctrl; n = 8) e expostos ao Triclosan (TCS, n = 8). Médias \pm E.P.M. Símbolos abertos indicam diferenças significativas em relação aos valores normóxicos. Os asteriscos indicam uma diferença significativa entre os grupos Ctrl e TCS no mesmo $P_{in}O_2$.

Tabela 8: Valores médios da necessidade ventilatória - $\dot{V}_G/\dot{M}O_2$ (mL.mmol⁻¹) de *B. amazonicus* dos grupos controle (CTRL - n = 8) e exposto ao triclosan (TCS - n = 8).

PiO ₂ (mmHg)	$\dot{V}_G/\dot{M}O_2$ (mL.mmol ⁻¹)	
	CTRL	TCS
140	173,23 ± 9,30	x
120	184,32 ± 13,70	156,20 ± 3,66
100	208,69 ± 13,65	175,15 ± 5,99
80	245,13 ± 16,75	211,64 ± 11,20
60	325,21 ± 35,39	366,60 ± 12,36
40	529,08 ± 74,91	457,94 ± 21,66
20	902,04 ± 107,98	1007,38 ± 119,03
10	1275,15 ± 171,58	1310,15 ± 180

Médias ± EPM. Valor em negrito - indica diferença significativa em relação aos valores iniciais de normóxia.

Figura 21: Necessidade ventilatória ($\dot{V}_G/\dot{M}O_2$), de *Brycon amazonicus*



Os grupos controle (Ctrl; n = 8) e exposto ao Triclosan (TCS, n = 8) durante reduções nas tensões de O₂ da água inspirada (P_{in}O₂). Médias ± E.P.M. Símbolos abertos indicam diferença significativa em relação aos valores normóxicos.

Os valores médios da frequência cardíaca (f_H - bpm) de *B. amazonicus* dos grupos controle e exposto ao triclosan, em normóxia e hipóxia gradual, estão apresentados na tabela 8 e figura 22.

Os valores médios da f_H do grupo controle foi de 65 bpm para normóxia, e manteve-se constante nas tensões de 140 e 60 mmHg, com valores de 65 a 56 bpm e nas ternsões de 40- 10 ocorreu uma bradicardia e a f_H atingiu valor mínimo de 27,23 bpm, correspondendo uma redução de aproximadamente de 58% comparado com os valores em normóxia.

No grupo exposto a f_H manteve-se constante somente até a tensão de O_2 de 80 mmHg (57,81 \pm 1,56 bpm), abaixo da qual, sofreu reduções significativas, atingindo o valor mínimo de 27 bpm na tensão de O_2 de 10 mmHg, correspondendo uma redução de aproximadamente 52% e comparando o exposto em relação ao controle houve diferença significativa nas tensões de 60 e 40 mmHg.

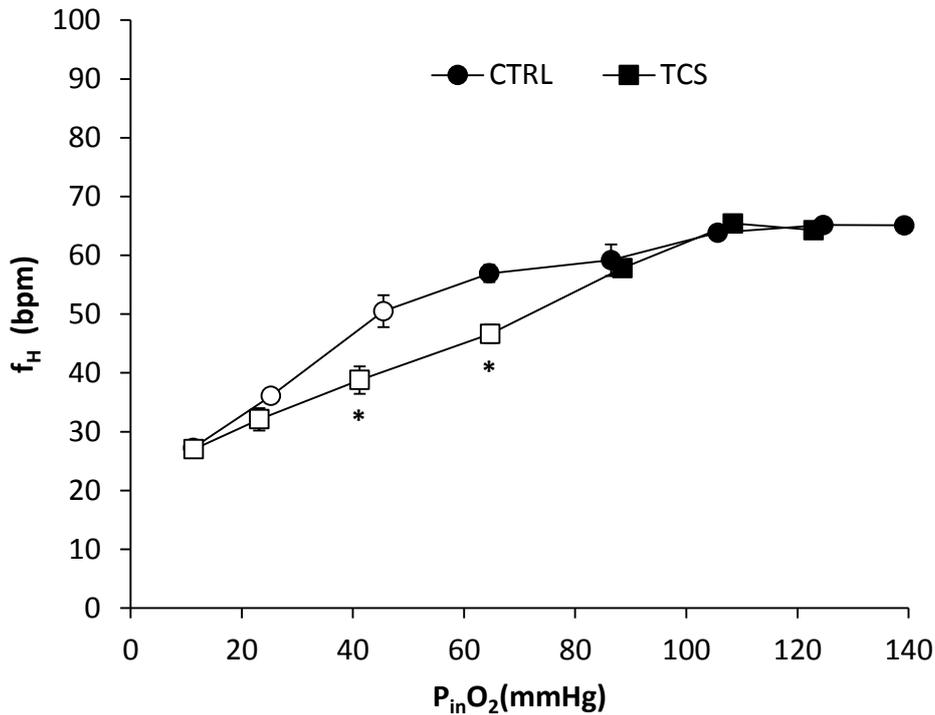
A análise de variância two-way indicou que houve interação significativa entre a exposição para o TCS e a hipóxia para a frequência cardíaca (f_H) e considerando o nível de significância de 5%.

Tabela 9: Valores médios de frequência cardíaca (f_H) de *B. amazonicus* dos grupos controle (CTRL - n = 8) e exposto ao triclosan (TCS - n = 8) em normóxia e hipóxia gradual.

PiO ₂ (mmHg)	f _H (bpm)	
	CTRL	TCS
140	65,12 \pm 1,16	x
120	65,16 \pm 0,82	64,31 \pm 1,18
100	63,88 \pm 2,67	65,42 \pm 0,84
80	59,17 \pm 1,45	57,81 \pm 1,56
60	56,91 \pm 2,72	46,63 \pm 2,33 *
40	50,49 \pm 1,23	38,78 \pm 1,91 *
20	36,08 \pm 1,07	32,11 \pm 1,65
10	27,23 \pm 1,37	27,01 \pm 0,81

Médias \pm EPM. Valor em negrito - indica diferença significativa em relação aos valores iniciais de normóxia; * indica diferença significativa entre os grupos experimentais (P < 0,05).

Figura 22: Frequência cardíaca (f_H) de *Brycon amazonicus* durante reduções nas tensões de O₂ da água inspirada



Grupo controle (Ctrl; n = 8); grupo exposto ao Triclosan (TCS, n = 8); tensões de O₂ da água inspirada ($P_{in}O_2$). Médias \pm E.P.M. Símbolos abertos indicam diferença significativa em relação aos valores normóxicos. Asteriscos indicam diferença significativa entre os grupos Ctrl e TCS em uma mesma $P_{in}O_2$.

4.2. Western Blotting

Alguns parâmetros morfológico como massa corporal, comprimento do peixes, massa ventricular e massa atrial foram coletados após eutanásia dos espécimes para comparação entre os grupos. Os valores referentes a estes se encontram organizados na tabela 10.

Os valores obtidos da MVR foram 0,07815 ($\pm 0,003967$) e 0,06858 ($\pm 0,003027$) para o grupo controle e exposto respectivamente. Apesar da aparente diferença nos valores, testes estatísticos demonstraram não existir diferença significativa ($P=0,0841$).

TABELA 10: Valores dos parâmetros morfológicos dos grupos controle (CT - n = 6) e exposto ao triclosan (TCS - n = 6)

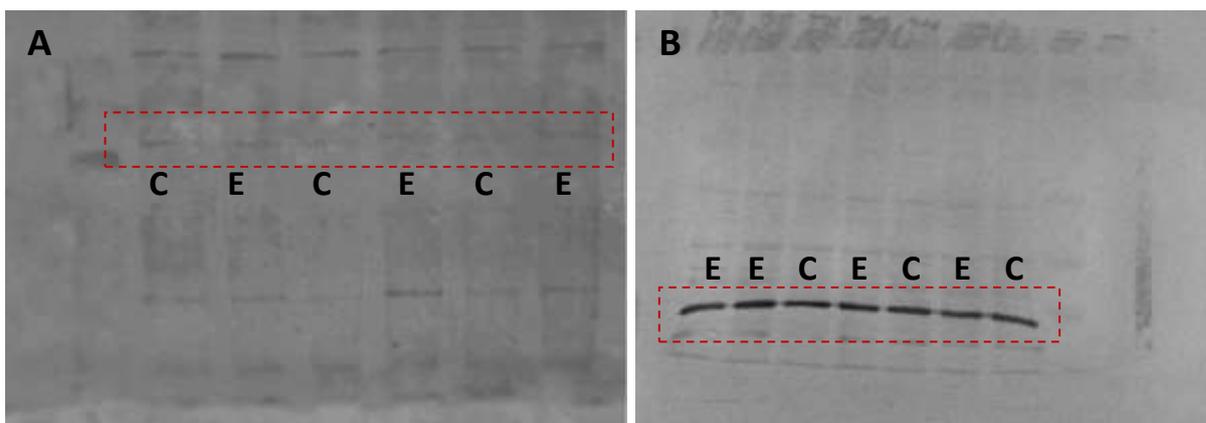
Animal	Massa corporal (g)	Comprimento (cm)	Massa ventricular (g)	Massa atrial (g)	Massa ventricular relativa
CT1	144,9	22,5	0,127	0,0177	0,087647
CT2	178,4	24	0,1133	0,0261	0,063509
CT3	158,1	23,5	0,1317	0,0249	0,083302
CT4	121,1	20	0,0887	0,0083	0,073245
CT5	134,1	22,5	0,1178	0,0219	0,087845
CT6	144,9	22,5	0,1013	0,0179	0,073353
TCS1	128,2	22	0,072	0,0247	0,056162
TCS2	152,9	23	0,1133	0,0181	0,074101
TCS3	181,6	24,5	0,1274	0,0417	0,070154
TCS4	137,9	22,5	0,09	0,0287	0,065265
TCS5	178,7	24	0,1382	0,0393	0,077336
TCS6	137,3	22	0,094	0,0165	0,068463

4.2.1. Expressão de Proteínas

Bandas representando a expressão da proteína Canal Ca^{2+} Tipo L voltagem dependente pode ser observada na membrana obtida pelo método de Western blotting na figura 23.

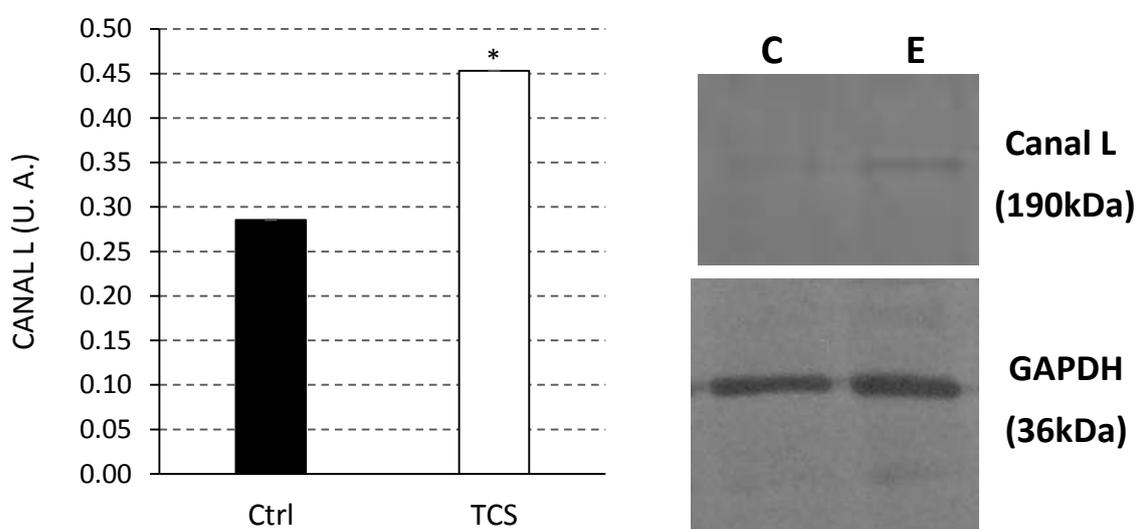
Os níveis de expressão do canal de cálcio L, após normalização, de cada grupo pode ser observado na figura 24 juntamente com as respectivas bandas de western blotting. O canal L ocorreu principalmente em duas isoformas, uma forma menor, de 164 kDa, e uma maior, de 190 kDa (GRABNER et al., 1991; ZAMPONI et al., 2015). Para o estudo analisou-se a maior forma, banda em destaque na figura 24.

Figura 23: Membranas ilustrando expressão do Canal cálcio tipo L



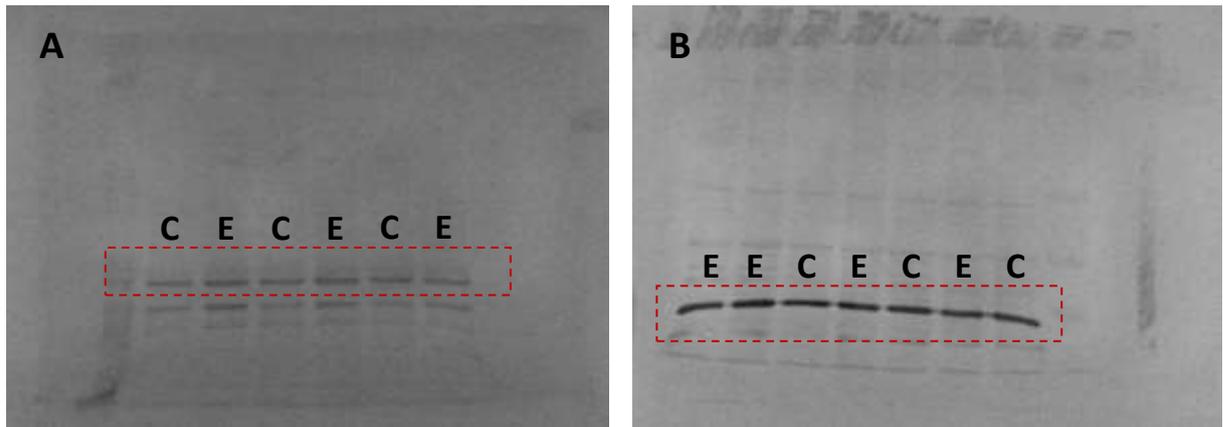
A – Expressão dos canais cálcio tipo L em tecido cardíaco ventricular em espécimes do grupo controle (C) e exposto (E) de *Brycon amazonicus*. **B** - Expressão de GAPDH em tecido cardíaco ventricular de espécimes do grupo controle (C) e exposto (E) de *Brycon amazonicus*

Figura 24: Níveis de expressão dos Canais de Cálcio L em *Brycon amazonicus*



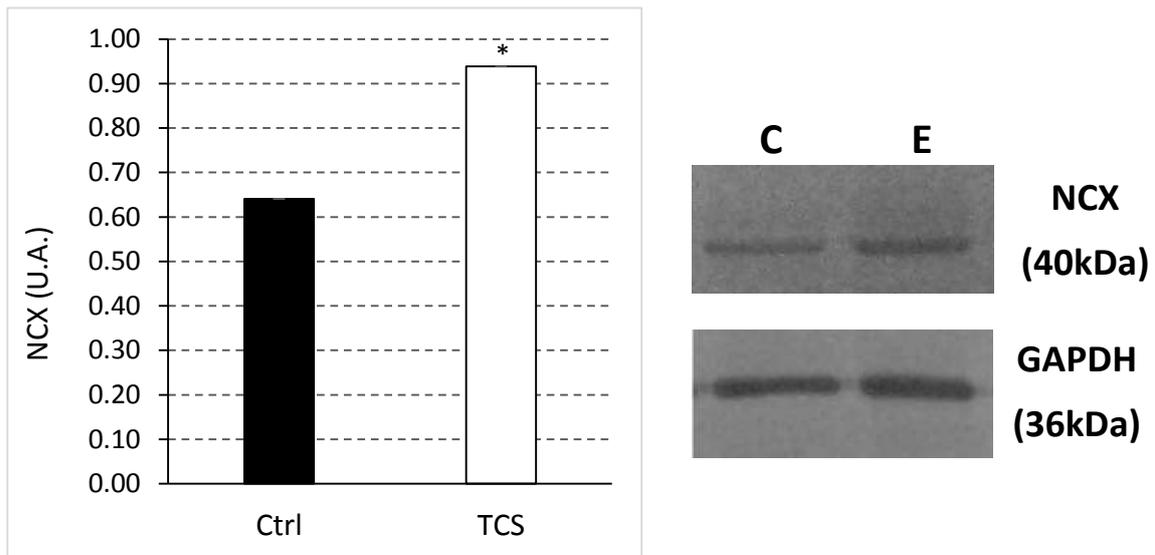
Nível de expressão dos canais Cálcio L (U. A.) em tecido cardíaco ventricular de espécimes do grupo controle (barra cinza) e sua respetiva banda juntamente a do GAPDH (C) e do grupo expostos (barra em branco) e sua respetiva banda juntamente a do GAPDH (E)

Figura 25: Membranas ilustrando expressão do Trocador NCX



A – Expressão do NCX em tecido cardíaco ventricular em espécimes do grupo controle (C) e exposto (E) de *Brycon amazonicus*. **B** - Expressão de GAPDH em tecido cardíaco ventricular de espécimes do grupo controle (C) e exposto (E) de *Brycon amazonicus*

Figura 26: Níveis de expressão dos Canais de Cálcio L em *Brycon amazonicus*



Nível de expressão do NCX (U. A.) em tecido cardíaco ventricular de espécimes do grupo controle (barra em preto) e sua respectiva banda alinhado a do GAPDH (C) e do grupo expostos (barra em branco) e sua respectiva banda alinhado a do GAPDH (E)

Observou-se uma maior expressão dos canais de cálcio L no grupo exposto ($0,4530 \pm 0,01899$ U. A.) quando comparados ao grupo controle ($0,2853 \pm 0,02582$ U. A.). Através das análises estatísticas constatou-se que a diferença observada foi extremamente significativa ($P = 0,0004$).

Bandas representando a expressão do trocador NCX podem ser observadas na membrana resultante do protocolo de Western blotting na figura 25.

Os níveis de expressão do NCX, após normalização, de cada grupo podem ser observados na figura 26 juntamente com as respectivas bandas de western blotting. Verificou-se um maior nível de expressão do NCX no grupo exposto ($0,938985 \pm 0,08578$ U.A.) quando comparado ao grupo controle ($0,640378 \pm 0,04074$ U.A.). A diferença constatada foi confirmada significativa após análises estatísticas ($P=0,0104$).

5. DISCUSSÃO

5.1. Respostas Cardiorespiratórias *in vivo*.

5.1.2. Efeito de diferentes concentrações de TCS.

O primeiro achado surpreendente do presente trabalho foi a constatação de que após a adição de TCS ($1,3 \mu\text{g.L}^{-1}$), a água não atinge 100% de saturação de O_2 . A diminuição da solubilidade de oxigênio na água (mmHg) ocasionada pelo TCS (Triclosan) foi evidenciada tanto por eletrodos de fibra ótica quanto por eletrodos galvânicos e pelo método de Winkler. Apesar da utilização de diferentes metodologias, CAPKIN et al (2017) monitoraram parâmetros da qualidade de água em seu trabalho com trutas arco-íris e descrevem concentrações de O_2 de $9,4 \pm 0,3 \text{ mgO}_2.\text{L}^{-1}$ na água controle e $8,8 \pm 0,2 \text{ mgO}_2.\text{L}^{-1}$ após adição de $1,5 \mu\text{g.L}^{-1}$ de TCS, corroborando os resultados obtidos no presente estudo.

A redução na capacidade de saturação da água com O_2 após a adição de TCS, *per se*, já pode se constituir num fator limitante para a vida aquática. Infelizmente, não há na literatura nenhuma informação acerca desse efeito químico do triclosan e estudos posteriores serão necessários para elucidar esta questão e servir de base para a regulamentação acerca de concentrações máximas permitidas em águas para a manutenção da vida aquática.

De acordo com DUBE; HOSETTI, 2010 a atividade respiratória dos peixes é uma das primeiras variáveis fisiológicas a ser afetada em virtude da contaminação aquática. Conseqüentemente, parâmetros intimamente associados à demanda respiratória tais como o consumo de O_2 , a frequência ventilatória, a taxa de tosse e a irritação/lesão branquiais são indicadores robustos de nos animais e, concomitantemente, da qualidade da água.

No presente trabalho, verificou-se perda de equilíbrio temporária, movimentação lenta ou confusa e olhos com coloração opaca após aproximadamente 8 horas de exposição do TCS nas concentrações de 1,3 e $13 \mu\text{g.L}^{-1}$, sendo que tais alterações também foram relatadas nos trabalhos de PRIYATHA e CHITRA (2018) para *Anabas testudineus* na concentração de $1,4 \text{ mg.L}^{-1}$.

Em contrapartida, nos minutos iniciais de aplicação, foram observadas mudanças comportamentais do animal, com natação rápida e descontrolada, movimento errático, muitas vezes tentando escapar do respirômetro, perda de equilíbrio, dificuldade respiratória

(evidenciada pelos registros ventilatórios) e produção de muco pelo corpo. As mesmas mudanças no comportamento do animal foram descritas por ÇELEBI e GÖK (2018) para *Danio rerio* e *Poecilia reticulata* expostos ao TCS em diferentes concentrações (0,01; 0,02; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5 mg.L⁻¹).

Nas 96 horas de experimento e nas três concentrações de TCS (0,13; 1,3 e 13 µg.L⁻¹), houve uma redução na taxa metabólica padrão do grupo exposto em relação ao controle, com decréscimos aproximados de 5%, 43% e 55% respectivamente. De acordo com ESCARRONE et al. (2016) o TCS pode permanecer ativo dentro do organismo exposto, aumentando a duração e a intensidade da contaminação. Tais efeitos poderiam explicar, ao menos em parte, a diminuição da taxa metabólica de rotina verificada no presente estudo.

PRIYATHA e CHITRA (2018) submeteram exemplares de *Anabas testudineus* ao TCS na concentração de 1,76 mg.L⁻¹ e verificaram que o mesmo é captado pelas brânquias, alterando sua morfologia, promovendo desequilíbrios osmóticos e iônicos, aumentando a produção de muco e levando ao comprometimento da função respiratória. Tais resultados corroboram os obtidos no presente trabalho.

De acordo com CAPKIN et al., (2017), a diminuição de O₂ disponível aos tecidos em resposta à exposição ao TCS deve-se a seus efeitos tóxicos sobre as membranas celulares. Muitas dessas ações tóxicas são atribuídas à sua capacidade de atravessar as membranas celulares e interromper processos de transporte iônico, comprometendo os parâmetros respiratórios. Tais autores expuseram exemplares de truta arco íris *Oncorhynchus mykiss* ao TCS na concentração de 0,5 µg.L⁻¹ por 40 dias e verificaram alterações histopatológicas tais como necrose nas brânquias, formação de centros melanomacrofágicos no baço e formação de vacúolos de gordura no fígado. Além disso, os autores verificaram danos significativos no DNA eritrocitário dos peixes.

PRIYATHA e CHITRA (2018) realizaram testes para a determinação da CL₅₀ de TCS para o peixe *Anabas testudineus* e encontraram o valor médio de 1,77 mg.L⁻¹. Os autores coletaram ainda tecidos dos exemplares que morreram em diferentes concentrações de TCS e verificaram, entre outras alterações branquiais, a ocorrência de aneurismas, desorganização lamelar, fusão e perda de lamelas secundárias na concentração de 1,6 mg.L⁻¹ e descolamento e hiperplasia do epitélio branquial e fusão e perda de lamelas secundárias na concentração de 1,8 mg.L⁻¹. Tais resultados poderiam explicar a redução da $\dot{M}O_2$ nas três concentrações de TCS utilizadas no presente trabalho.

A exposição a outros contaminantes também pode alterar significativamente a $\dot{M}O_2$ de peixes. A exposição crônica (96 horas via água) de matrinxã (*Brycon amazonicus*) e sub-crônica (30 dias via alimentação) de traíra (*Hoplias malabaricus*) a doses subletais de mercúrio inorgânico ($HgCl_2$) diminuiu a taxa metabólica de ambas as espécies (MONTEIRO et al., 2013). MARTINS et al., (2011) também verificaram este efeito após injeções intraperitoneais de microcistina na concentração de $100\mu g.Kg^{-1}$ em tilápia (*Oreochromis niloticus*). Reduções drásticas na taxa metabólica também foram descritas por (ANELLI-JR, 2010) após a exposição de *B. amazônicos* ao Roundup Transorb na concentração de $5 mg.L^{-1}$ por 96 h e por THOMAZ et al., (2009) após exposição de *O. niloticus* a $5 mg.L^{-1}$ de triclorfon por 96 h.

WANG et al., (2018) submeteram exemplares de peixinho-dourado, o *Carassius auratus*, ao TCS por 14 dias nas concentrações de $0.1399 mg.L^{-1}$ (1/8 LC₅₀), $0.2798 mg.L^{-1}$ (1/4 CL₅₀) e $0.5596 mg.L^{-1}$ (1/2 CL₅₀) e verificaram efeitos genotóxicos (aumento da frequência de micronúcleos e de anormalidades nucleares) bem como alterações na capacidade antioxidante no fígado dos peixes. Se o TCS causa efeitos semelhantes em músculos e brânquias, os mesmos poderiam explicar as reduções nos parâmetros respiratórios verificadas no presente trabalho.

Cabe salientar que na concentração de $1,3 \mu g.L^{-1}$ o TCS já causou efeitos significativos na taxa metabólica, efeitos estes semelhantes aos observados à $13 \mu g.L^{-1}$. Ademais, a concentração de triclosan de $1,3 \mu g.L^{-1}$ está muito abaixo dos valores de CL₅₀ das espécies de peixes já estudadas, como mostrado na tabela 4.

5.1.2. Efeito do TCS em normóxia e hipóxia gradual

A tomada de oxigênio ($\dot{M}O_2 - mmol.kg^{-1}.h^{-1}$) de *Brycon amazonicus* mostrou-se independente de concentração de O_2 no meio, característica de uma espécie oxirreguladora, capaz de manter a $\dot{M}O_2$ constante em torno de $3,35 mmol.kg^{-1}.h^{-1}$ até a tensão de água aproximadamente de 40 mmHg. Nas $P_{in}O_2$ inferiores, essa espécie não foi capaz de manter a $\dot{M}O_2$ constante, tornando-se dependente da concentração de O_2 na água.

A $\dot{M}O_2$ em normóxia obtida no presente trabalho para o grupo controle foi similar à obtida por MONTEIRO et al. (2013) para essa espécie utilizando respirômetro de fluxo constante (aberto).

De acordo com FERNANDES e RANTIN (1989), as espécies tropicais estão mais sujeitas à hipóxia ambiental e os baixos valores de P_cO_2 podem representar uma vantagem

adaptativa, permitindo uma maior capacidade de regular a tomada de O₂ do meio. Dessa maneira, o alto valor da P_cO₂ observado em *B. amazonicus* parece refletir o hábito e o habitat dessa espécie, sugerindo uma incapacidade em manter $\dot{M}O_2$ em ambientes com baixas tensões de O₂.

A exposição à dose de 1,3 µg/L gerou aumento significativo da P_cO₂ de cerca de 40 para 56 mmHg, ocasionando uma diminuição na capacidade de manter a tomada de O₂ constante e a $\dot{M}O_2$ da espécie que passou a ser dependente da concentração de O₂ do meio em tensões de O₂ mais baixas. Uma explicação para tais efeitos pode ser a intensa secreção de muco pelas brânquias após a exposição ao TCS, decorrente da irritação das mesmas. A camada de muco formada certamente contribuiu para a redução na $\dot{M}O_2$ do grupo TCS em relação ao Ctrl. O aumento da produção de muco tem sido descrito em diversos trabalhos após a exposição de peixes à contaminantes. A alta secreção de muco durante o tratamento com TCS foi observada no corpo e nas brânquias dos animais, tratando-se de um mecanismo de defesa dos peixes para prevenir a entrada de patógenos.

O aumento da secreção de muco em resposta à exposição a diferentes xenobióticos é largamente descrita na literatura. ALAZEMI, LEWIS e ANDREWS (2010) submeteram exemplares de *Gnathonemus petersii* a diferentes concentrações de cobre e verificaram hiperatividade das células mucosas na concentração de 0.1 mg.L⁻¹ e acumulação de uma espessa camada de muco sobre as brânquias na concentração de 0.5 mg.L⁻¹. A excessiva produção de muco também foi descrita após contaminação de truta arco-íris com mercúrio (LOCK e OVERBEEKE, 1981), de *Lepomis macrochirus* com malation (RICHMOND e DUTTA, 1989), em *Carassius auratus*. O mesmo foi observado após exposição de *Etropus maculatus* ao inseticida organoclorado clordecone (ASIFA; CHITRA, 2013) e de *Anabas testudineus* ao TCS (PRIYATHA E CRITRA, 2018).

Além disso, é importante ressaltar que PRIYATHA e CHITRA (2018) demonstraram que o TCS causa lesões branquiais em seu trabalho com *A. testudineous*. Se o mesmo ocorreu no presente estudo, tais lesões também poderiam ter contribuído para a redução da $\dot{M}O_2$ do grupo TCS.

SHIM et al. (2016) estudaram o efeito do TCS nas concentrações de 15 e 30 µM sobre embriões de *Danio rerio* 24 hpf (24 h após a fertilização) e verificaram que o aumento na concentração de TCS aumenta o consumo de O₂ basal das mitocôndrias mas não diminui a taxa de sobrevivência ou os batimentos cardíacos nessas concentrações. Os autores também demonstraram que o TCS inibe a fosforilação oxidativa, a capacidade respiratória de reserva (a

quantidade de ATP extra que pode ser produzida por fosforilação oxidativa no caso de um aumento súbito na demanda de energia) e estimula o vazamento de prótons. Tais achados permitiram aos autores concluir que: 1) A inibição da fosforilação oxidativa indica que o TCS inibe a produção mitocondrial de ATP; 2) O aumento no vazamento de prótons indica desacoplamento mitocondrial causado pelo TCS; 3) A inibição da capacidade respiratória de reserva pelo TCS indica disfunção mitocondrial. Em conjunto, tais achados apontam o TCS como um desacoplador mitocondrial.

Trabalhos realizados com microcistina em tilápia do Nilo - *Oreochromis niloticus* constataram redução no consumo de oxigênio do exposto em relação ao controle após 48 horas de injeção intraperitoneal do referido composto com dose de 100 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ provocando a elevação do PcO_2 (MARTINS et al., 2011) e análogo aos encontrados em nosso estudo.

Experimentos com *B.amazonicus* submetidos a mercúrio na concentração de 0,15 mg.L^{-1} por 96 horas resultaram na elevação da PcO_2 para valores médios de 52,5 mmHg e na redução da habilidade dessa espécie de sobreviver a condições de hipóxia (MONTEIRO et al., 2013), semelhantes aos resultados encontrados para a exposição ao TCS no presente trabalho.

No presente estudo a exposição ao TCS não apenas reduziu os valores de $\dot{\text{M}}\text{O}_2$ como também aumentou significativamente a PcO_2 , reduzindo a capacidade de manter a tomada de O_2 constante e, conseqüentemente, reduzindo as chances de sobrevivência em ambientes hipóxicos. Resposta similar foi obtida por (THOMAZ et al., 2009a) para a tilapia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) após exposição ao inseticida organofosforado triclorfon.

A manutenção da homeostasia respiratória depende da capacidade de mobilização de mecanismos compensatórios, como o aumento na ventilação branquial ($\dot{\text{V}}_{\text{G}}$), para manter o gradiente de oxigênio entre a água e o sangue o mais elevado possível, assegurando assim a eficiência nas trocas gasosas (FERNANDES; RANTIN, 1989). Sendo assim, elevações na $\dot{\text{V}}_{\text{G}}$ têm sido descritas como uma primeira resposta à redução na tensão de O_2 na água para várias espécies de peixes.

No presente estudo, ambos os grupos experimentais aumentaram a $\dot{\text{V}}_{\text{G}}$ progressiva e significativamente durante a hipóxia até a tensão de 20 mmHg, abaixo da qual este parâmetro se reduziu. Esses aumentos em ambos os grupos foram caracterizados por aumentos proporcionais tanto no volume ventilatório (V_{T}) quanto na frequência respiratória (f_{R}).

Diferentes espécies de peixes utilizam diferentes estratégias para ajustar a ventilação branquial em resposta à hipóxia. Um tipo de resposta é o aumento na $\dot{\text{V}}_{\text{G}}$ devido a um maior

aumento na f_R do que no V_T , assim como observado na carpa comum, *Cyprinus carpio* (MARVIN; HEATH, 1968), bluegill, *Lepomis macrochirus* (LOMHOLT; JOHANSEN, 1979) e pacu, *Piaractus mesopotamicus* (AGUIAR; KALININ; RANTIN, 2002). Contudo, a resposta mais comumente observada em teleósteos é um maior aumento no volume ventilatório (V_T), quando comparado com a frequência respiratória (f_R). Alguns exemplos de espécies que apresentam esse tipo de resposta são: tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus* (FERNANDES; RANTIN, 1989), traíra, *Hoplias malabaricus* (KALININ; RANTIN; GLASS, 1993), curimatá, *Prochilodus scrofa* (FERNANDES; BARRIONUEVO; RANTIN, 1995) e cascudo, *Hypostomus regani* (MATTIAS; RANTIN; FERNANDES, 1998).

Do ponto de vista metabólico, este maior aumento no V_T em relação à f_R é, aparentemente, a forma mais eficaz de aumentar a \dot{V}_G , uma vez que o custo energético deste processo é, geralmente, muito alto em teleósteos (JOHANSEN; LENFANT; GRIGG, 1967) Segundo (RANTIN et al. (1992), a utilização desta estratégia baseia-se no baixo custo para a manutenção da velocidade e constância da contração muscular, enquanto que uma alta frequência de contração é limitada pelo trabalho muscular contra uma alta viscosidade da água ventilada.

No presente estudo, a \dot{V}_G de ambos os grupos experimentais não diferiu significativamente de normóxia até a tensão de O_2 de 60 mmHg, resposta também observada por OLLE (2007) em matrinxãs expostos ao metilparation. No entanto, nas $P_{in}O_2$ abaixo de 60 mmHg a \dot{V}_G do grupo exposto foi significativamente inferior a do grupo controle, redução esta que pode estar associada a uma redução nos mecanismos compensatórios que mantém elevações de f_R e V_T . Assim, enquanto o grupo controle apresentou uma elevação na \dot{V}_G de ~90% entre 120 e 10 mmHg, para o grupo exposto essa elevação ficou em torno de ~60%

A análise das respostas respiratórias de ambos os grupos experimentais no presente estudo mostra que o grupo controle consegue elevar a f_R e o V_T de maneira significativa e progressiva ao longo das diferentes tensões de O_2 hipóxicas até 20 mmHg enquanto que o grupo exposto ao TCS só consegue elevar a f_R e o V_T até a $P_{in}O_2$ de 60 mmHg. Além disso, o grupo exposto ao TCS apresentou valores de V_T e f_R significativamente inferiores ao controle abaixo de 60 mmHg. Tais diferenças nestes parâmetros explicam a menor capacidade ventilatória apresentada pelo grupo exposto ao TCS.

Vários estudos apontam reduções na f_R de peixes após a exposição à inseticidas OPs. Esse foi o caso para a tilápia do Nilo após exposição ao triclorfon (THOMAZ et al., 2009a), tilápia

mossambica (*Tilapia mossambica*) após exposição ao malation (BASHA et al., 1984) e perca “spangled” (*L. unicolor*) após exposição ao temefós (GEHRKE, 1988). De acordo com GEHRKE (1988), uma possível razão para essa resposta seria o rápido efeito dos OPs sobre os nervos respiratórios. Infelizmente, há poucos estudos sobre possíveis efeitos do triclosan sobre o sistema nervoso. SZYCHOWSKI et al. (2018), estudando culturas primárias de neurônios neocorticais de camundongos expostas a uma concentração ambientalmente relevante de TCS (10 μM), verificaram a ocorrência de neurotoxicidade e apoptose. Assim, não se pode descartar a hipótese de uma possível ação inibitória do TCS no sistema nervoso de peixes que pudesse induzir a redução nas respostas ventilatórias observadas no presente estudo. Entretanto, mais estudos serão necessários para verificar possíveis efeitos do TCS no sistema nervoso de peixes.

Adicionalmente, CHEREDNICHENKO et al. (2012) submeteram ratos a injeções intraperitoneais de TCS nas doses de 6,25; 12,5 e 25 mg.Kg^{-1} e verificaram que o mesmo atua como disruptor do acoplamento excitação contração do músculo esquelético devido a um desacoplamento funcional entre os receptores de dihidropiridina (DHPR) da sarcolema e os canais de rianodina do retículo sarcoplasmático (RS) impedindo, dessa forma, a liberação de cálcio pelo RS e, conseqüentemente, redução drástica da força de contração. Se tal efeito ocorreu no presente estudo, o mesmo poderia explicar os menores valores de \dot{V}_G e V_T encontrados no grupo TCS.

A eficiência das brânquias como órgão trocador de O_2 pode ser avaliada por meio da necessidade ventilatória ($\dot{V}_G/\dot{M}\text{O}_2$) também chamada de requerimento branquial de convecção de água (DEJOURS, 1981). Aumentos na $\dot{V}_G/\dot{M}\text{O}_2$ em função da redução na disponibilidade de O_2 do meio são indicativos da redução na eficiência de extração de O_2 da corrente ventilatória, ou seja, uma maior quantidade de água deve passar pela superfície funcional respiratória para que a mesma quantidade de O_2 seja obtida. A $\dot{V}_G/\dot{M}\text{O}_2$ de ambos os grupos experimentais aumentou significativamente, mas com valores sempre superiores no grupo exposto, mostrando diminuição significativa da eficiência das brânquias na troca de O_2 após a exposição ao Triclosan, de forma que os peixes de tal grupo necessitaram ventilar uma quantidade muito maior de água para obter a mesma quantidade de O_2 do que os peixes do grupo controle. Desta forma pode-se inferir que a contaminação com Triclosan, além dos efeitos acima citados, implica em um maior gasto energético para a troca gasosa. O mesmo padrão de resposta foi obtido por OLLE (2007) para os exemplares de matrinxã expostos ao metilparation.

A frequência cardíaca (f_H) média de *B. amazonicus* do grupo controle manteve-se em ~62 bpm de normóxia até a $P_{\text{in}}\text{O}_2$ de 60 mmHg, a partir da qual houve uma redução progressiva e

significativa deste parâmetro (bradicardia), com o menor valor de f_H sendo registrado na $P_{in}O_2$ de 10 mmHg (~27 bpm). Tal resposta foi semelhante à encontrada por OLLE (2007) para esta espécie e próxima à verificada para espécies de peixes tropicais como o pacu, *Piaractus mesopotamicus* (50 bpm; RANTIN *et al.*, 1998) e o tambaqui, *Colossoma macropomum* (48 bpm; RANTIN; KALININ; DE FREITAS, 1996) e abaixo da f_H média de espécies ativas como o dourado, *Salminus maxillosus* (97 bpm; DE SALVO SOUZA *et al.*, 2001), e os atuns *Katsuwonus pelamis* e *Thunnus albacares* ((BUSHNELL; BRILL, 1992; KORSMEYER *et al.*, 1997). Em todas essas espécies, a resposta à redução da tensão de O_2 foi uma bradicardia, que se tornou acentuada quando os peixes foram expostos a níveis de O_2 na água iguais ou inferiores à tensão crítica (P_cO_2).

De acordo com FARRELL (1984), a bradicardia é uma resposta reflexa ativada pela hipóxia para assegurar a performance do coração durante a hipóxia do miocárdio. Assim a redução da f_H dos matrinxãs do grupo controle provavelmente preserva o gasto energético do coração quando a disponibilidade de O_2 se torna reduzida. Além disso, a bradicardia aumenta o tempo de residência do sangue dentro do ventrículo, o que poderia permitir um aumento da extração de O_2 pelo próprio miocárdio esponjoso. Ademais, GLASS *et al.* (1991) sugeriram que a bradicardia aumenta a eficiência da transferência de gases nas brânquias pelo desenvolvimento da interação cardio-respiratória.

A f_H tem sido usada como indicador dos efeitos tóxicos de contaminantes ambientais em peixes (TEUSCHLER *et al.*, 2005). De acordo com HEATH (1995), reduções na f_H com concomitantes aumentos na ventilação branquial são as respostas comuns quando os peixes são expostos a uma variedade de xenobióticos. Reduções na f_H foram descritas como resultado da exposição ao tolueno (STOSS; HAINES, 1979), metilmercúrio(DIAL, 1978), aos pesticidas carbaril, malation e parathion (SOLOMON; WEIS, 1979) e ao tricloroetileno(VILLALOBOS *et al.*, 2000) em “medaka”, *Oryzias latipes*, bem como após exposição do “killifish”, *Fundulus heteroclitus*, a inseticidas (WEIS; WEIS, 1974). OLLE (2007) também verificou esse padrão de resposta após expor exemplares de matrinxã ao metilparation. De acordo com GEHRKE, (1988), esta bradicardia é resultante do aumento da inibição cardíaca pelas fibras colinérgicas que inervam o coração.

No presente trabalho, a bradicardia do grupo exposto ao TCS teve início em $P_{in}O_2$ abaixo de 80 mmHg, ou seja, numa tensão de O_2 mais elevada que no grupo controle. Entretanto, a f_H do grupo TCS só foi significativamente inferior à registrada para o grupo controle nas tensões de O_2 de 40 e 20 mmHg. Tal resultado poderia sugerir um reduzido efeito do TCS sobre a

função cardíaca. Entretanto, deve-se ressaltar que a f_H é um parâmetro que avalia apenas o cronotropismo cardíaco e um possível efeito do TCS sobre a força de contração (que determinará o volume sistólico) não pode ser descartado. Tal hipótese é amparada pelo trabalho de SALEY et al. (2016), que expuseram larvas (de 8 a 120 h pós-fertilização) de *Danio rerio* a diferentes concentrações de TCS (0.4, 40, e 400 $\mu\text{g.L}^{-1}$) e, na concentração mais elevada, verificaram reduções de ~30% na f_H , de ~40% no volume sistólico (ou seja, redução na força de contração). Essa redução na f_H corrobora os dados do presente trabalho.

CHEREDNICHENKO et al. (2012) verificaram que o TCS reduz significativamente o débito cardíaco (produto da f_H pelo volume sistólico) de ratos após 10 minutos da aplicação via injeções intraperitoniais. Segundo esses autores, o TCS atua como disruptor do acoplamento excitação-contração no músculo cardíaco pois bloqueia a corrente de cálcio pelos canais L, reduzindo a liberação de cálcio cálcio-induzida pelo RS. Como resultado, ocorre uma significativa redução na força de contração cardíaca e, conseqüentemente, redução do débito cardíaco.

Além disso, de acordo com (AHN et al., 2008) o TCS é estruturalmente similar aos bifenilos policlorados (PCBs) não-semelhantes a dioxinas e sensibiliza canais de RyR encontrados em várias formas de músculo e outros tecidos animais excitáveis. Esse foi o primeiro trabalho a identificar os canais RyRs como alvos sensíveis ao TCS, criando uma preocupação adicional em relação à potencial neurotoxicidade desse composto.

5.2. Expressão de Proteínas Cardíacas

Alterações nas condições ambientais podem promover modificações morfológicas no tecido cardíaco como estratégia de compensação para manutenção da homeostase (GAMPERL, 2004) . Em épocas reprodutivas, o tecido cardíaco de salmonídeos machos sofre hipertrofia como mecanismo de compensação para a alta demanda cardíaca no período de desova (GAMPERL, 2004).

A hipertrofia parcial do tecido cardíaco pode constituir uma estratégia para compensar efeitos inotrópicos por condições adversas como variações na temperatura (SHIELS; VORNANEN; FARRELL, 2002). Neste contexto, a massa ventricular relativa (MVR) estabelece uma razão entre a massa ventricular e a massa corporal do organismo em estudo e, desta forma, se apresenta como parâmetro que possibilita analisar e comparar diferenças de

tecido ventricular não apenas entre diferentes organismos, mas também os efeitos de circunstâncias distintas às quais os animais podem estar sujeitos.

No presente estudo não se verificou diferença significativa entre a MVR dos dois grupos experimentais ($P = 0,0841$). Sendo assim, pode-se presumir duas situações: a primeira, na qual o TCS na concentração utilizada e por exposição de curta duração (48h) não se apresente como fator estressante ao peixe, ou a segunda, na qual teriam ocorrido alterações a nível molecular no tecido cardíaco. Pela análise da expressão das proteínas envolvidas no manejo de cálcio cardíaco (trocaador sódio-cálcio ou NCX e canais L) confirmou-se a segunda hipótese em virtude das alterações observadas, situação semelhante a encontrada por RISSOLI et al., (2017).

O fluxo iônico entre o meio intra e extracelular no miócito é imprescindível para o funcionamento do acoplamento excitação-contração, responsável pelo desempenho cardíaco.

O balanço é garantido pela atividade de estruturas proteicas que atuam como transportadores iônicos (BERS, 2002). No presente estudo constatou-se diferença na expressão destas proteínas, nomeadamente o canal de cálcio tipo L ($P = 0,0004$) e o NCX ($P = 0,0104$), no grupo exposto ao Triclosan quando comparado ao controle.

Estímulos externos (fatores ambientais potencialmente estressantes) podem alterar a expressão e o funcionamento destas proteínas, por vezes como estratégia compensatória (VORNANEN; SHIELS; FARRELL, 2002). RISSOLI et al., (2017) após submeter espécimes de matrinxã ao condicionamento natatório extensivo, verificou alteração nos níveis de expressão de proteínas do acoplamento excitação-contração ao comparar grupos sujeitos a diferentes velocidades de fluxo de água.

FU et al., (2007) demonstraram que a aconitina, um terpenóide azotado presente em medicamentos tradicionais chineses, aumenta a expressão de canais de rianodina e de NCX em cardiomiócitos de ratos neonatos.

O NCX, trocaador iônico presente no sarcolema, constitui o principal mecanismo responsável pela extrusão do cálcio transiente. Este atua como intermediário para o transporte de íons, através de um processo de antiporte no qual importa três íons sódio para o meio intracelular enquanto bombeia um íon cálcio no outro sentido, para o meio extracelular (BERS, 2002). O aumento verificado na sua expressão pode estar associado a um desequilíbrio iônico intracelular desencadeado pelo TCS, nomeadamente da concentração de cálcio transiente. Neste contexto podemos inferir sobre duas situações: (1) uma concentração alta, acima do normal, de cálcio transiente; (2) um déficit de cálcio transiente.

No primeiro caso, o aumento na expressão de NCX ocorreria como medida compensatória visto a importância deste para extrusão do cálcio, necessária para o relaxamento do músculo cardíaco (SHIELS; VORNANEN; FARRELL, 2002). Já no segundo caso, o aumento na expressão estaria relacionado ao potencial que o NCX possui de atuar no modo reverso. No modo reverso, o NCX inverte os sentidos de transporte de íons, promovendo entrada de cálcio no espaço intracelular em troca da saída de sódio. Ao atuar no modo reverso, o NCX pode atuar na liberação de cálcio intracelular pelo processo de liberação de cálcio cálcio-induzida (CICR), culminando num aumento da concentração de cálcio transiente (VORNANEN; SHIELS; FARRELL, 2002). Desse modo, o NCX pode desempenhar um papel determinante e eficaz na contração cardíaca (NECO et al., 2010). Esta situação ocorre em espécies de peixes nos quais o cálcio para a ativação da contração provém principalmente do meio extracelular, com pequena ou insignificante contribuição do retículo sarcoplasmático.

Peixes considerados ativos geralmente se enquadram nesta situação (VORNANEN, 1999), como por exemplo o matrinxã pelos seus hábitos natatórios e migratórios. RISSOLI et al., (2017) evidenciaram o potencial do NCX como ativador da contração em matrinxã. No estudo verificaram diminuição no desempenho cardíaco em grupos exercitados, quando comparados ao controle, após inibição do NCX.

O sentido do funcionamento do NCX é determinado por gradientes de sódio e cálcio ao longo do sarcolema (VORNANEN; SHIELS; FARRELL, 2002). Desse modo, situações que promovam alterações no gradiente de sódio poderiam afetar o funcionamento do NCX. LARBIG et al., (2010) demonstrou que a ativação de correntes de Na^+ durante o potencial de ação de células cardíacas isoladas de camundongos promoveria um rápido influxo e acumulação de sódio intracelular. Isso, juntamente com uma despolarização a potenciais positivos desencadeariam a ação reversa do NCX. A interferência do TCS nestes canais de sódio poderia constituir um outro mecanismo contribuinte para o desequilíbrio iônico e aumento na expressão do NCX. Entretanto, mais estudos serão necessários para elucidar esse mecanismo em diferentes espécies de peixes.

LARBIG et al., (2010) sugere ainda que a situação descrita anteriormente poderia atuar sinergicamente com ativação/abertura de canais de cálcio do tipo L, resultando numa ativação mais pronunciada do CICR. Outros autores discutem o potencial de atuação sinérgico dos canais L e do NCX para ativação da contratilidade cardíaca (NECO et al., 2010) e até mesmo para a contração cardíaca 'direta' (VORNANEN; SHIELS; FARRELL, 2002) sem dependência do retículo sarcoplasmático. Seria de se esperar, portanto, um aumento na expressão nos canais L

em paralelo ao aumento do NCX. Os resultados obtidos no presente trabalho aparentam corroborar esta situação, com aumento significativo da expressão de ambas as estruturas citadas.

Os canais de cálcio tipo L voltagem dependentes são estruturas presentes em junções sarcolema-retículo sarcoplasmático (RS). Perante estímulo elétrico (potencial de ação) transportam íons cálcio para o meio intracelular, que, por sua vez, atuam na ativação de canais de rianodina no RS (KAMP; HELL, 2000).

Os canais de rianodina são responsáveis pela extrusão do cálcio armazenado no RS para o citoplasma para posterior contração. O cálcio liberado pelo RS atua ainda sobre os canais L, inibindo a sua atividade, promovendo uma diminuição da entrada de cálcio por estas estruturas (BERS, 2002). Nestas circunstâncias, apesar de não ter sido avaliado diretamente, seria esperado semelhança na atividade dos canais L entre os grupos estudados. Porém, no grupo exposto ocorreu aumento na expressão de canais L, o que pode acarretar em um influxo aumentado de cálcio. Esta situação reforça a hipótese anterior de déficit na concentração de cálcio transiente, sugerindo a ação do TCS sobre os canais de rianodina, responsáveis pela liberação de cálcio do RS.

De fato, alguns autores relatam resultados que estariam de acordo com a situação descrita. (FRITSCH et al., 2013) no seu estudo com o TCS com *Pimephales promelas* relatou um aumento na expressão de canais L após 7 dias e redução na expressão de canais rianodina após 1 dia de exposição. CHEREDNICHENKO et al., (2012) propõem que o TCS atuaria interferindo na sinalização entre os canais L e os de rianodina, principalmente por interação inibitória no canal L, causando uma redução de 50 % no influxo de cálcio via canais-L em miócitos cardíacos. Nesta circunstância, o aumento na expressão de canais L verificado no presente estudo poderia constituir uma estratégia compensatória. Com a inibição de entrada de cálcio pelo canal L, o aumento na densidade destas proteínas poderia também promover aumento no influxo de cálcio por disponibilizar ‘mais sítios de entrada’ para o cálcio, superando a condição negativa provocada pelo TCS e assim, proporcionar o retorno à homeostase cardíaca.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho permitiram as seguintes conclusões:

- Em presença de triclosan (TCS) a água não atinge 100% de saturação com O_2 ;
- Mesmo em baixas concentrações, o triclosan reduz a capacidade respiratória de *B. amazonicus*, visto que a magnitude de redução na taxa metabólica ($\dot{M}O_2$) observada na concentração de $1,3 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ foi a mesma verificada à de $13 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.
- A exposição ao TCS não apenas reduziu os valores de $\dot{M}O_2$ como também aumentou significativamente a P_{cO_2} , reduzindo a capacidade de manter a tomada de O_2 constante e, conseqüentemente, reduzindo as chances de sobrevivência em ambientes hipóxicos.
- A ventilação branquial do grupo exposto ao TCS é significativamente inferior à do grupo controle em hipóxia moderada e severa ($P_{in}O_2$ abaixo de 60 mmHg) redução esta que pode estar associada a uma redução nos mecanismos compensatórios que mantêm elevações da frequência respiratória (f_R) e do volume ventilatório (V_T);
- O grupo exposto ao TCS apresentou valores de V_T e f_R significativamente inferiores ao controle abaixo de 60 mmHg. Tais diferenças nestes parâmetros explicam a menor capacidade ventilatória apresentada pelo grupo exposto ao TCS;
- A necessidade ventilatória ($\dot{V}_G/\dot{M}O_2$) de ambos os grupos experimentais aumenta significativamente durante a hipóxia gradual, mas com valores sempre superiores no grupo exposto, mostrando diminuição significativa da eficiência das brânquias na troca de O_2 , de forma que os peixes de tal grupo necessitaram ventilar uma quantidade muito maior de água para obter a mesma quantidade de O_2 do que os peixes do grupo controle.
- A contaminação com TCS implica em um maior gasto energético para a troca gasosa.
- A exposição ao TCS na concentração de $1,3 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ por 96h teve um pequeno efeito depressor na frequência cardíaca dos peixes;
- O TCS não alterou significativamente os parâmetros morfométricos cardíacos nem a massa ventricular relativa;
- Existem sequências de aminoácidos semelhantes nas proteínas de matrinxã e de mamíferos, o que pôde ser comprovado pela ligação dos anticorpos específicos para mamíferos anti-NCX e anti-canal L nas respectivas proteínas de peixe;

- O TCS induziu um aumento significativo na expressão dos canais de Ca^{2+} do tipo L, mostrando seu potencial de atuação sobre a sinalização dos canais L e, conseqüentemente, no acoplamento excitação-contração cardíaco;
- O aumento na densidade de canais L pode corresponder a um possível mecanismo para manutenção da concentração de cálcio intracelular na tentativa de sobrepujar possíveis efeitos inotrópicos negativos do TCS, já verificado por outros autores;
- O aumento significativo na expressão do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) indicou que a possível diminuição nas concentrações intracelulares de cálcio causada pelo TCS pode ter demandando um maior influxo de Ca^{2+} via modo reverso do NCX e, posteriormente, estimulando a atividade de canais de cálcio L para atuação sinérgica no processo de contração, ou mesmo a ativação da contração pela atividade direta do NCX reverso.
- Em conjunto, os resultados obtidos no presente trabalho mostram que o TCS, mesmo em baixas concentrações e em exposições de curta duração (96h) diminui a capacidade respiratória da espécie e interfere no manejo de cálcio cardíaco.
- O efeito depressor da função cardio-respiratória *in vivo*, bem como as alterações na expressão de proteínas envolvidas no acoplamento excitação-contração cardíaco de matrinxã reforçam a necessidade não apenas de reavaliação da utilização de TCS em produtos de consumo como também do estabelecimento de limites máximos permitidos em águas para consumo humano e conservação da vida aquática.

7. REFERÊNCIAS

- ADOLFSSON-ERICI, M. et al. Triclosan, a commonly used bactericide found in human milk and in the aquatic environment in Sweden. **Chemosphere**, v. 46, n. 9–10, p. 1485–1489, mar. 2002.
- AGÜERA, A. et al. Evaluation of triclosan and biphenylol in marine sediments and urban wastewaters by pressurized liquid extraction and solid phase extraction followed by gas chromatography mass spectrometry and liquid chromatography mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 480, n. 2, p. 193–205, 24 mar. 2003.
- AGUIAR, L. H.; KALININ, A. L.; RANTIN, F. T. The effects of temperature on the cardio-respiratory function of the neotropical fish *Piaractus mesopotamicus*. **Journal of Thermal Biology**, v. 27, n. 4, p. 299–308, 1 ago. 2002.
- AHN, K. C. et al. In Vitro Biologic Activities of the Antimicrobials Triclocarban, Its Analogs, and Triclosan in Bioassay Screens: Receptor-Based Bioassay Screens. **Environmental Health Perspectives**, v. 116, n. 9, p. 1203–1210, set. 2008.
- ALAN G. HEATH. **Water Pollution and Fish Physiology**. Disponível em: <<https://www.crcpress.com/Water-Pollution-and-Fish-Physiology/Heath/p/book/9780873716321>>. Acesso em: 4 out. 2018.
- ALEXANDRE HONCZARYK; LUÍZ ANTÔNIO KIOSHI AOKI. Circular Técnica 33. Produção Comercial de Alevinos de matrinxã na Amazônia ocidental. 2009.
- ALTIMIRAS, J.; AISSAOUI, A.; TORT, L. Is the short-term modulation of heart rate in teleost fish physiologically significant? Assessment by spectral analysis techniques. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira De Pesquisas Medicas E Biologicas**, v. 28, n. 11–12, p. 1197–1206, dez. 1995.
- ARANAMI, K.; READMAN, J. W. Photolytic degradation of triclosan in freshwater and seawater. **Chemosphere**, v. 66, n. 6, p. 1052–1056, jan. 2007.
- ASIFA, K. P.; CHITRA, K. C. Determination of Median Lethal Concentration (LC50) and Behavioral Effects of Chlordecone in the Cichlid fish, *Etilopius maculatus*. v. 4, n. 3, p. 4, 2013.
- BARCELÓ, D. Emerging pollutants in water analysis. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 10, p. xiv–xvi, 1 nov. 2003.
- BENDZ, D. et al. Occurrence and fate of pharmaceutically active compounds in the environment, a case study: Höje River in Sweden. **Journal of Hazardous Materials**, v. 122, n. 3, p. 195–204, 15 jul. 2005.
- BENOTTI, M. J. et al. Pharmaceuticals and endocrine disrupting compounds in U.S. drinking water. **Environmental Science & Technology**, v. 43, n. 3, p. 597–603, 1 fev. 2009.
- BERNARDO BALDISSEROTTO; ELISABETH CRISCUOLO URBINATI; JOSÉ EURICO POSSEBON CYRINO. **Biologia e Fisiologia de Peixes Neotropicais de Água Doce**. . Acesso em: 10 maio. 2018.

- BERS, D. M. Cardiac excitation-contraction coupling. **Nature**, v. 415, n. 6868, p. 198–205, 10 jan. 2002.
- BESTER, K. Fate of triclosan and triclosan-methyl in sewage treatment plants and surface waters. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 49, n. 1, p. 9–17, jul. 2005.
- BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Pharmaceutical drugs in the environment. **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 523–530, ago. 2003.
- BREITBURG, D. Effects of hypoxia, and the balance between hypoxia and enrichment, on coastal fishes and fisheries. **Estuaries**, v. 25, n. 4, p. 767–781, 1 ago. 2002.
- BREITBURG, D. L. et al. Hypoxia, nitrogen, and fisheries: integrating effects across local and global landscapes. **Annual Review of Marine Science**, v. 1, p. 329–349, 2009.
- BUSHNELL, P. G.; BRILL, R. W. Oxygen transport and cardiovascular responses in skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) and yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) exposed to acute hypoxia. **Journal of Comparative Physiology. B, Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology**, v. 162, n. 2, p. 131–143, 1992.
- C V, P.; KC, C. Acute toxicity of triclosan on the native freshwater fish, *Anabas testudineus* (Bloch, 1792): behavioural alterations and histopathological lesions. v. 6, 9 mar. 2018.
- CALAFAT, A. M. et al. Exposure of the U.S. population to bisphenol A and 4-tertiary-octylphenol: 2003-2004. **Environmental Health Perspectives**, v. 116, n. 1, p. 39–44, jan. 2008.
- CAMPANHA, M. B. et al. A 3-year study on occurrence of emerging contaminants in an urban stream of São Paulo State of Southeast Brazil. **Environmental Science and Pollution Research International**, v. 22, n. 10, p. 7936–7947, maio 2015.
- CAMPBELL, H. A.; EGGINTON, S. The vagus nerve mediates cardio-respiratory coupling that changes with metabolic demand in a temperate nototheniid fish. **Journal of Experimental Biology**, v. 210, n. 14, p. 2472–2480, 15 jul. 2007.
- CAPKIN, E. et al. Antimicrobial agents, triclosan, chloroxylenol, methylisothiazolinone and borax, used in cleaning had genotoxic and histopathologic effects on rainbow trout. **Chemosphere**, v. 182, p. 720–729, set. 2017.
- CECH; BRAUNER. *Techniques in Whole Animal Respiratory Physiology*. p. 8, 2011.
- ÇELEBI, H.; GÖK, O. Effect of triclosan exposure on mortality and behavioral changes of *Poecilia reticulata* and *Danio rerio*. **Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal**, v. 24, n. 5, p. 1327–1341, 4 jul. 2018.
- CHAPMAN, L. J.; MCKENZIE, D. J. Chapter 2 Behavioral Responses and Ecological Consequences. In: RICHARDS, J. G.; FARRELL, A. P.; BRAUNER, C. J. (Eds.). . **Fish Physiology**. Hypoxia. [s.l.] Academic Press, 2009. v. 27p. 25–77.

CHAU, W. C.; WU, J.; CAI, Z. Investigation of levels and fate of triclosan in environmental waters from the analysis of gas chromatography coupled with ion trap mass spectrometry. **Chemosphere**, v. 73, n. 1 Suppl, p. S13-17, ago. 2008.

CHEREDNICHENKO, G. et al. Correction for Cherednichenko et al., Triclosan impairs excitation-contraction coupling and Ca²⁺ dynamics in striated muscle. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 40, p. 16393–16393, 2012a.

CHEREDNICHENKO, G. et al. Triclosan impairs excitation–contraction coupling and Ca²⁺ dynamics in striated muscle. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 35, p. 14158–14163, 28 ago. 2012b.

CHEREDNICHENKO, G. et al. Triclosan impairs excitation–contraction coupling and Ca²⁺ dynamics in striated muscle. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 35, p. 14158–14163, 28 ago. 2012c.

CLARK, T. D.; SANDBLOM, E.; JUTFELT, F. Aerobic scope measurements of fishes in an era of climate change: respirometry, relevance and recommendations. **The Journal of Experimental Biology**, v. 216, n. Pt 15, p. 2771–2782, 1 ago. 2013.

CONNELL, D. W. **Basic Concepts of Environmental Chemistry, Second Edition**. [s.l.] CRC Press, 2005.

COOGAN, M. A. et al. Algal bioaccumulation of triclocarban, triclosan, and methyl-triclosan in a North Texas wastewater treatment plant receiving stream. **Chemosphere**, v. 67, n. 10, p. 1911–1918, maio 2007.

COOGAN, M. A.; LA POINT, T. W. Snail bioaccumulation of triclocarban, triclosan, and methyltriclosan in a North Texas, USA, stream affected by wastewater treatment plant runoff. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 27, n. 8, p. 1788–1793, ago. 2008.

CROFTON, K. M. et al. Short-term in vivo exposure to the water contaminant triclosan: Evidence for disruption of thyroxine. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 24, n. 2, p. 194–197, set. 2007.

DALLA VIA, J. et al. Influence of long-term hypoxia exposure on the energy metabolism of *Solea solea*. II. Intermediary metabolism in blood, liver and muscle. **MARINE ECOLOGY PROGRESS SERIES**, v. 111, p. 17–27, 1 ago. 1994.

DAVIS, J. C. Minimal Dissolved Oxygen Requirements of Aquatic Life with Emphasis on Canadian Species: a Review. **Journal of the Fisheries Research Board of Canada**, v. 32, n. 12, p. 2295–2332, 1 dez. 1975.

DE SALVO SOUZA, R. H. et al. Ventilation, gill perfusion and blood gases in dourado, *Salminus maxillosus Valenciennes (teleostei, characidae)*, exposed to graded hypoxia. **Journal of Comparative Physiology. B, Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology**, v. 171, n. 6, p. 483–489, ago. 2001.

DE SOUSA, D. N. R. et al. Electrical conductivity and emerging contaminant as markers of surface freshwater contamination by wastewater. **The Science of the Total Environment**, v. 484, p. 19–26, 15 jun. 2014.

DEJOURS, P. **Principles of comparative respiratory physiology**. [s.l.] Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 1981.

Design and setup of intermittent-flow respirometry system for aquatic organisms - Svendsen - 2016 - Journal of Fish Biology - Wiley Online Library. , [s.d.]. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jfb.12797>>. Acesso em: 8 maio. 2018

DIAL, N. A. Methylmercury: some effects on embryogenesis in the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*. **Teratology**, v. 17, n. 1, p. 83–91, fev. 1978.

DR. MICHAEL D. ABRÀMOFF, ABRAMOFF; DR. PAULO J. MAGALHÃES; DR. SUNANDA J. RAM. **Image Processing with ImageJ Biophotonics International**, 2004.

DUBE, P. N.; HOSETTI, B. B. Behaviour surveillance and oxygen consumption in the freshwater fish *Labeo rohita* (Hamilton) exposed to sodium cyanide. **Biotechnology in Animal Husbandry (Serbia)**, 2010.

EDWARDS, M. et al. Pharmaceutical and personal care products in tile drainage following surface spreading and injection of dewatered municipal biosolids to an agricultural field. **The Science of the Total Environment**, v. 407, n. 14, p. 4220–4230, 1 jul. 2009.

ESCARRONE, A. L. V. et al. Uptake, tissue distribution and depuration of triclosan in the guppy *Poecilia vivipara* acclimated to freshwater. **The Science of the Total Environment**, v. 560–561, p. 218–224, 01 2016.

FAIR, P. A. et al. Occurrence of triclosan in plasma of wild Atlantic bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) and in their environment. **Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)**, v. 157, n. 8–9, p. 2248–2254, set. 2009.

FANG, J.-L. et al. Occurrence, efficacy, metabolism, and toxicity of triclosan. **Journal of Environmental Science and Health. Part C, Environmental Carcinogenesis & Ecotoxicology Reviews**, v. 28, n. 3, p. 147–171, jul. 2010.

FARRELL, A. P. A review of cardiac performance in the teleost heart: intrinsic and humoral regulation. **Canadian Journal of Zoology**, v. 62, n. 4, p. 523–536, 1 abr. 1984.

FERNANDES, M. N.; BARRIONUEVO, W. R.; RANTIN, F. T. Effects of thermal stress on respiratory responses to hypoxia of a South American Prochilodontid fish, *Prochilodus scrofa*. **Journal of Fish Biology**, v. 46, n. 1, p. 123–133, 1 jan. 1995.

FERNANDES, M. N.; RANTIN, F. T. Respiratory responses of *Oreochromis niloticus* (Pisces, Cichlidae) to environmental hypoxia under different thermal conditions. **Journal of Fish Biology**, v. 35, n. 4, p. 509–519, 1 out. 1989.

FIORUCCI, A. R.; BENEDETTI FILHO, E. **A importância do oxigênio dissolvido em ecossistemas aquáticos [The importance of dissolved oxygen in aquatic ecosystems]**. **Química Nova na Escola**, n. 22, p. 10 - 16, 2005. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000130&pid=S1983-4195201400030000300027&lng=en>. Acesso em: 10 maio. 2018.

FRANCISCO DE ASSIS ESTEVES. **Fundamentos de limnologia**. - [2. ed.]. / 1998 - Livros. Disponível em: <http://bibcentral.ufpa.br/arquivos/135000/135300/19_135323.htm>. Acesso em: 7 jul. 2018.

FRITSCH, E. B. et al. Triclosan impairs swimming behavior and alters expression of excitation-contraction coupling proteins in fathead minnow (*Pimephales promelas*). **Environmental Science and Technology**, v. 47, n. 4, p. 2008–2017, 2013.

FU, M. et al. Disruption of the intracellular Ca²⁺ homeostasis in the cardiac excitation-contraction coupling is a crucial mechanism of arrhythmic toxicity in aconitine-induced cardiomyocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 354, n. 4, p. 929–936, 2007.

GAMPERL, A. K. Cardiac plasticity in fishes: environmental influences and intraspecific differences. **Journal of Experimental Biology**, v. 207, n. 15, p. 2539–2550, 2004.

GEE, R. H. et al. Oestrogenic and androgenic activity of triclosan in breast cancer cells. **Journal of applied toxicology: JAT**, v. 28, n. 1, p. 78–91, jan. 2008.

GEHRKE, P. C. Acute Cardio-respiratory responses of Spangled Perch, *Leiopotherapon unicolor* (Gunther 1859), to Sublethal concentrations of Zinc, Temephos and 2,4-D. **Marine and Freshwater Research**, v. 39, n. 6, p. 767–774, 1988.

GIOVANNI VITTI MORO et al. **Piscicultura de água doce “Multiplicando conhecimento”**. [s.l.] Embrapa Pesca e Aquicultura, 2013.

GLASS, M. L. et al. Cardio-respiratory synchronization and myocardial function in hypoxic carp, *Cyprinus carpio* L. **Journal of Fish Biology**, v. 39, n. 2, p. 143–149, 1 ago. 1991.

GRABNER, M. et al. Calcium channels from *Cyprinus carpio* skeletal muscle. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, n. 3, p. 727–731, 1991.

HALDEN, R. U.; PAULL, D. H. Co-occurrence of triclocarban and triclosan in U.S. water resources. **Environmental Science & Technology**, v. 39, n. 6, p. 1420–1426, 15 mar. 2005.

HEIDLER, J.; HALDEN, R. U. Mass balance assessment of triclosan removal during conventional sewage treatment. **Chemosphere**, v. 66, n. 2, p. 362–369, jan. 2007.

HILL, J. W. et al. **Chemistry and Life: An Introduction to General, Organic, and Biological Chemistry**. 5 edition ed. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall College Div, 1996.

HUGHES, G. M.; SUNDERS, R. L. Responses of the Respiratory Pumps to Hypoxia in the Rainbow Trout (*Salmo Gairdneri*). **Journal of Experimental Biology**, v. 53, n. 3, p. 529–545, 1 dez. 1970.

JAMES, M. O. et al. Triclosan is a potent inhibitor of estradiol and estrone sulfonation in sheep placenta. **Environment International**, v. 36, n. 8, p. 942–949, nov. 2010.

JOHANSEN, K.; LENFANT, C.; GRIGG, G. C. Respiratory control in the lungfish, *Neoceratodus forsteri* (krefft). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 20, n. 3, p. 835–854, 1 mar. 1967.

- JONES, J. R. E. The Reactions of Fish to Water of Low Oxygen Concentration. **Journal of Experimental Biology**, v. 29, n. 3, p. 403–415, 1 set. 1952.
- JUNIOR, A.; CARLOS, L. Efeitos de diferentes formulações comerciais do herbicida Roundup® sobre a função cardiorespiratória de matrinxã, *Brycon amazonicus* (Teleostei, Characidae). 28 abr. 2010.
- KALININ, A. L.; RANTIN, F. T.; GLASS, M. L. Dependence on body size of respiratory function in *Hoplias malabaricus* (Teleostei, Erythrinidae) during graded hypoxia. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 12, n. 1, p. 47–51, jul. 1993.
- KALININ; RANTIN; GLASS. **SciELO Brasil - www.scielo.br**. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=6169278&pid=S0034-7108200000020000800008&lng=en>. Acesso em: 9 nov. 2017.
- KAMP, T. J.; HELL, J. W. Regulation of cardiac L-type calcium channels by protein kinase A and protein kinase C. **Circ.Res.**, v. 87, n. 12, p. 1095–1102, 2000.
- KANTIANI, L. et al. Triclosan and methyl-triclosan monitoring study in the northeast of Spain using a magnetic particle enzyme immunoassay and confirmatory analysis by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of hydrology**, 2008.
- KASPRZYK-HORDERN, B.; DINSDALE, R. M.; GUWY, A. J. The removal of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs during wastewater treatment and its impact on the quality of receiving waters. **Water Research**, v. 43, n. 2, p. 363–380, fev. 2009.
- KOLPIN, D. W. et al. Pharmaceuticals, Hormones, and Other Organic Wastewater Contaminants in U.S. Streams, 1999–2000: A National Reconnaissance. **Environmental Science & Technology**, v. 36, n. 6, p. 1202–1211, 1 mar. 2002.
- KORSMEYER, K. E. et al. Oxygen transport and cardiovascular responses to exercise in the yellowfin tuna *Thunnus albacares*. **The Journal of Experimental Biology**, v. 200, n. 14, p. 1987, 1 jul. 1997.
- KUSTER, M. et al. Analysis and occurrence of pharmaceuticals, estrogens, progestogens and polar pesticides in sewage treatment plant effluents, river water and drinking water in the Llobregat river basin (Barcelona, Spain). **Journal of Hydrology**, v. 358, n. 1–2, p. 112–123, 2008.
- LANGDON, K. A. et al. Field dissipation of 4-nonylphenol, 4-t-octylphenol, triclosan and bisphenol A following land application of biosolids. **Chemosphere**, v. 86, n. 10, p. 1050–1058, mar. 2012.
- LARBIG, R. et al. Activation of reverse $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ exchange by the Na^+ current augments the cardiac Ca^{2+} transient: evidence from NCX knockout mice. **The Journal of Physiology**, v. 588, n. 17, p. 3267–3276, 2010.
- LEVY, C. W. et al. Molecular basis of triclosan activity. **Nature**, v. 398, n. 6726, p. 383–384, 1 abr. 1999.

- LINDSTRÖM, A. et al. Occurrence and environmental behavior of the bactericide triclosan and its methyl derivative in surface waters and in wastewater. **Environmental Science & Technology**, v. 36, n. 11, p. 2322–2329, 1 jun. 2002.
- LOMHOLT, J. P.; JOHANSEN, K. Hypoxia Acclimation in Carp: How It Affects O₂ Uptake, Ventilation, and O₂ Extraction from Water. **Physiological Zoology**, v. 52, n. 1, p. 38–49, 1979.
- MARTINS, N. D. et al. Microcystin-LR: How it affects the cardio-respiratory responses to hypoxia in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Chemosphere**, v. 84, n. 1, p. 154–159, jun. 2011.
- MARVIN, D. E.; HEATH, A. G. Cardiac and respiratory responses to gradual hypoxia in three ecologically distinct species of fresh-water fish. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 27, n. 1, p. 349–355, 1 out. 1968.
- MATTIAS, A. T.; RANTIN, F. T.; FERNANDES, M. N. Gill respiratory parameters during progressive hypoxia in the facultative air-breathing fish, *Hypostomus regani* (Loricariidae). **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 120, n. 2, p. 311–315, 1 maio 1998.
- MONTAGNER, C. C. et al. Occurrence and potential risk of triclosan in freshwaters of São Paulo, Brazil--the need for regulatory actions. **Environmental Science and Pollution Research International**, v. 21, n. 3, p. 1850–1858, fev. 2014.
- MONTEIRO, D. A. et al. Cardiorespiratory responses to graded hypoxia in the neotropical fish matrinxã (*Brycon amazonicus*) and traíra (*Hoplias malabaricus*) after waterborne or trophic exposure to inorganic mercury. **Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)**, v. 140–141, p. 346–355, 15 set. 2013.
- MORRALL, D. et al. A field study of triclosan loss rates in river water (Cibolo Creek, TX). **Chemosphere**, v. 54, n. 5, p. 653–660, fev. 2004.
- MOYES E SCHULTE. **Livro: Principios de Fisiologia Animal - Christopher D Moyes**. . Acesso em: 7 maio. 2018.
- NECO, P. et al. Sodium-calcium exchange is essential for effective triggering of calcium release in mouse heart. **Biophysical Journal**, v. 99, n. 3, p. 755–764, 2010.
- NISHI, I.; KAWAKAMI, T.; ONODERA, S. Monitoring of triclosan in the surface water of the Tone Canal, Japan. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 80, n. 2, p. 163–166, fev. 2008.
- OKUMURA, T.; NISHIKAWA, Y. Gas chromatography—mass spectrometry determination of triclosans in water, sediment and fish samples via methylation with diazomethane. **Analytica Chimica Acta**, v. 325, n. 3, p. 175–184, 30 maio 1996.
- OLLE, C. D. Efeito do inseticida organofosforado metilparation (Folisuper 600BR) sobre a função cardio-respiratória do peixe teleosteo matrinxã, *Brycon cephalus*. 10 jul. 2007.
- ORVOS, D. R. et al. Aquatic toxicity of triclosan. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 21, n. 7, p. 1338–1349, jul. 2002.

- PALENSKE, N. M.; NALLANI, G. C.; DZIALOWSKI, E. M. Physiological effects and bioconcentration of triclosan on amphibian larvae. **Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology: CBP**, v. 152, n. 2, p. 232–240, ago. 2010.
- PAUL, K. B. et al. Developmental triclosan exposure decreases maternal and neonatal thyroxine in rats. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 29, n. 12, p. 2840–2844, dez. 2010.
- PENG, X. et al. Occurrence of steroid estrogens, endocrine-disrupting phenols, and acid pharmaceutical residues in urban riverine water of the Pearl River Delta, South China. **The Science of the Total Environment**, v. 397, n. 1–3, p. 158–166, 1 jul. 2008.
- PÖRTNER, H.-O.; GRIESHABER, M. K. **Critical Po₂(s) in oxyconforming and oxyregulating animals gas exchange, metabolic rate and the mode of energy production**. Inbook. Disponível em: <<http://epic.awi.de/2446/>>. Acesso em: 10 maio. 2018.
- PRIYATHA, C. V.; CHITRA, K. C. Acute toxicity of triclosan on the native freshwater fish, *Anabas testudineus* (Bloch, 1792): behavioral alterations and histopathological lesions. v. 6, p. 7, 2018.
- RAMASWAMY, B. R. et al. GC-MS analysis and ecotoxicological risk assessment of triclosan, carbamazepine and parabens in Indian rivers. **Journal of Hazardous Materials**, v. 186, n. 2–3, p. 1586–1593, 28 fev. 2011.
- RANTIN, F. T. et al. Respiratory responses to hypoxia in relation to mode of life of two erythrinid species (*Hoplias malabaricus* and *Hoplias lacerdae*). **Journal of Fish Biology**, v. 41, n. 5, p. 805–812, 1 nov. 1992.
- RANTIN, F. T. et al. Cardio-respiratory responses in two ecologically distinct erythrinids (*Hoplias malabaricus* and *Hoplias lacerdae*) exposed to graded environmental hypoxia. **Environmental Biology of Fishes**, v. 36, n. 1, p. 93–97, 1 jan. 1993.
- RANTIN, F. T.; KALININ, A. L.; DE FREITAS, J. Cardio-respiratory function of swimming blue crab *Callinectes danae* Smith, during normoxia and graded hypoxia. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 198, n. 1, p. 1–10, 1 jun. 1996.
- RAUT, S. A.; ANGUS, R. A. Triclosan has endocrine-disrupting effects in male western mosquitofish, *Gambusia affinis*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 29, n. 6, p. 1287–1291, jun. 2010.
- RISSOLI, R. Z. et al. Effects of exercise training on excitation-contraction coupling, calcium dynamics and protein expression in the heart of the Neotropical fish *Brycon amazonicus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 214, n. September, p. 85–93, 2017.
- RULE, K. L.; EBBETT, V. R.; VIKESLAND, P. J. Formation of chloroform and chlorinated organics by free-chlorine-mediated oxidation of triclosan. **Environmental Science & Technology**, v. 39, n. 9, p. 3176–3185, 1 maio 2005.

SABALIUNAS, D. et al. Environmental fate of Triclosan in the River Aire Basin, UK. **Water Research**, v. 37, n. 13, p. 3145–3154, jul. 2003.

SALEY, A. et al. Cardiac Toxicity of Triclosan in Developing Zebrafish. **Zebrafish**, v. 13, n. 5, p. 399–404, out. 2016.

SALIERNO, J. D.; LOPES, M.; RIVERA, M. Latent effects of early life stage exposure to triclosan on survival in fathead minnows, *Pimephales promelas*. **Journal of Environmental Science and Health. Part. B, Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, v. 51, n. 10, p. 695–702, 2 out. 2016.

SANCHEZ-PRADO, L. et al. Monitoring the photochemical degradation of triclosan in wastewater by UV light and sunlight using solid-phase microextraction. **Chemosphere**, v. 65, n. 8, p. 1338–1347, nov. 2006.

SATCHELL, G. H. **Physiology and Form of Fish Circulation**. [s.l.] Cambridge University Press, 1991.

SCHULEK, E. L.W. Winkler (1863–1939). **Talanta**, v. 10, n. 5, p. 423–428, 1 maio 1963.

SCHULTZ, M. M.; BARTELL, S. E.; SCHOENFUSS, H. L. Effects of triclosan and triclocarban, two ubiquitous environmental contaminants, on anatomy, physiology, and behavior of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 63, n. 1, p. 114–124, jul. 2012.

SCHURMANN, H.; STEFFENSEN, J. F. Effects of temperature, hypoxia and activity on the metabolism of juvenile Atlantic cod. **Journal of Fish Biology**, v. 50, n. 6, p. 1166–1180, 1 jun. 1997.

SHIELS, H. A.; VORNANEN, M.; FARRELL, A. P. The force-frequency relationship in fish hearts - A review. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, v. 132, n. 4, p. 811–826, 2002.

SINGER, H. et al. Triclosan: Occurrence and Fate of a Widely Used Biocide in the Aquatic Environment: Field Measurements in Wastewater Treatment Plants, Surface Waters, and Lake Sediments. **Environmental Science & Technology**, v. 36, n. 23, p. 4998–5004, 1 dez. 2002.

SNYDER, S. et al. Effect of closed v. intermittent-flow respirometry on hypoxia tolerance in the shiner perch *Cymatogaster aggregata*. **Journal of Fish Biology**, v. 88, n. 1, p. 252–264, jan. 2016.

SOLOMON, H. M.; WEIS, J. S. Abnormal circulatory development in medaka caused by the insecticides carbaryl, malathion and parathion. **Teratology**, v. 19, n. 1, p. 51–62, 1 fev. 1979.

STEFFENSEN. Manual do Aquaresp. **User's guide**, 2015.

STEFFENSEN, J. F. Some errors in respirometry of aquatic breathers: How to avoid and correct for them. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 6, n. 1, p. 49–59, jan. 1989.

STOKER, T. E.; GIBSON, E. K.; ZORRILLA, L. M. Triclosan exposure modulates estrogen-dependent responses in the female wistar rat. **Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology**, v. 117, n. 1, p. 45–53, set. 2010.

- STOSS, F. W.; HAINES, T. A. The effects of toluene on embryos and fry of the Japanese medaka *Oryzias latipes* with a proposal for rapid determination of maximum acceptable toxicant concentration. **Environmental Pollution** (1970), v. 20, n. 2, p. 139–148, 1 out. 1979.
- SUAREZ, S. et al. Kinetics of triclosan oxidation by aqueous ozone and consequent loss of antibacterial activity: relevance to municipal wastewater ozonation. **Water Research**, v. 41, n. 12, p. 2481–2490, jun. 2007.
- SVENDSEN, M. B. S.; BUSHNELL, P. G.; STEFFENSEN, J. F. Design and setup of intermittent-flow respirometry system for aquatic organisms. **Journal of Fish Biology**, v. 88, n. 1, p. 26–50, 1 jan. 2016.
- SZYCHOWSKI, K. A. et al. Triclosan-Evoked Neurotoxicity Involves NMDAR Subunits with the Specific Role of GluN2A in Caspase-3-Dependent Apoptosis. **Molecular Neurobiology**, 19 abr. 2018.
- TATARAZAKO, N. et al. Effects of triclosan on various aquatic organisms. **Environmental Sciences: An International Journal of Environmental Physiology and Toxicology**, v. 11, n. 2, p. 133–140, 2004.
- TAYLOR, E. W.; JORDAN, D.; COOTE, J. H. Central control of the cardiovascular and respiratory systems and their interactions in vertebrates. **Physiological Reviews**, v. 79, n. 3, p. 855–916, jul. 1999.
- TEUSCHLER, L. K. et al. The interaction effects of binary mixtures of benzene and toluene on the developing heart of medaka (*Oryzias latipes*). **Chemosphere**, v. 58, n. 9, p. 1283–1291, mar. 2005.
- THOMAZ, J. M. et al. Cardio-respiratory function and oxidative stress biomarkers in Nile tilapia exposed to the organophosphate insecticide trichlorfon (NEGUVON). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, n. 5, p. 1413–1424, jul. 2009a.
- THOMAZ, J. M. et al. Cardio-respiratory function and oxidative stress biomarkers in Nile tilapia exposed to the organophosphate insecticide trichlorfon (NEGUVON®). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, n. 5, p. 1413–1424, 1 jul. 2009b.
- TOPP, E. et al. Runoff of pharmaceuticals and personal care products following application of biosolids to an agricultural field. **The Science of the Total Environment**, v. 396, n. 1, p. 52–59, 15 jun. 2008.
- VASCONCELOS, E. DA S. Análise da expressão de proteínas envolvidas no manejo de cálcio cardíaco nos répteis píton (*Python molurus*), cascavel sul-americana (*Crotalus durissus terrificus*) e jacaré-de-papo-amarelo (*Caiman latirostris*) em jejum e nos períodos digestivo e pós-absortivo. 18 dez. 2014.
- VILLALOBOS, NULL et al. Thiobencarb-induced embryotoxicity in medaka (*Oryzias latipes*): stage-specific toxicity and the protective role of chorion. **Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)**, v. 48, n. 2–3, p. 309–326, 1 mar. 2000.

- VORNANEN, M. Na⁺/Ca²⁺(+) exchange current in ventricular myocytes of fish heart: Contribution to sarcolemmal Ca²⁺ influx. **Journal of Experimental Biology**, v. 202, n. 13, p. 1763–1775, 1999.
- VORNANEN, M.; SHIELS, H. A.; FARRELL, A. P. Plasticity of excitation – contraction coupling in fish cardiac. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 132, p. 827–846, 2002.
- WALTMAN, E. L.; VENABLES, B. J.; WALLER, W. T. Triclosan in a North Texas wastewater treatment plant and the influent and effluent of an experimental constructed wetland. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 25, n. 2, p. 367–372, 1 fev. 2006.
- WANG, C. et al. Adverse Effects of Triclosan and Binary Mixtures with 17 β -Estradiol on Testicular Development and Reproduction in Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) at Environmentally Relevant Concentrations. **Environmental Science & Technology Letters**, v. 5, n. 3, p. 136–141, 13 mar. 2018a.
- WANG, F. et al. Effects of triclosan on acute toxicity, genetic toxicity and oxidative stress in goldfish (*Carassius auratus*). **Experimental Animals**, v. 67, n. 2, p. 219–227, 2018b.
- WEIS, P.; WEIS, J. S. Cardiac malformations and other effects due to insecticides in embryos of the killifish, *Fundulus heteroclitus*. **Teratology**, v. 10, n. 3, p. 263–267, 1 dez. 1974.
- WU, J.-L. et al. Triclosan determination in water related to wastewater treatment. **Talanta**, v. 72, n. 5, p. 1650–1654, 31 jul. 2007.
- WU, R. S. S. et al. Aquatic Hypoxia Is an Endocrine Disruptor and Impairs Fish Reproduction. **Environmental Science & Technology**, v. 37, n. 6, p. 1137–1141, 1 mar. 2003.
- XIE, Z. et al. Occurrence and distribution of triclosan in the German Bight (North Sea). **Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)**, v. 156, n. 3, p. 1190–1195, dez. 2008.
- YING, G.-G.; KOOKANA, R. S. Triclosan in wastewaters and biosolids from Australian wastewater treatment plants. **Environment International**, v. 33, n. 2, p. 199–205, fev. 2007.
- ZAMPONI, G. W. et al. The Physiology, Pathology, and Pharmacology of Voltage-Gated Calcium Channels and Their Future Therapeutic Potential. **Pharmacological Reviews**, v. 67, n. 4, p. 821–870, 2015.
- ZHAO, J.-L. et al. Occurrence and risks of triclosan and triclocarban in the Pearl River system, South China: from source to the receiving environment. **Journal of Hazardous Materials**, v. 179, n. 1–3, p. 215–222, 15 jul. 2010a.
- ZHAO, R.-S. et al. Trace determination of triclosan and triclocarban in environmental water samples with ionic liquid dispersive liquid-phase microextraction prior to HPLC-ESI-MS-MS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 397, n. 4, p. 1627–1633, jun. 2010b.
- ZORRILLA, L. M. et al. The effects of triclosan on puberty and thyroid hormones in male Wistar rats. **Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology**, v. 107, n. 1, p. 56–64, jan. 2009.