

Gisela Gonçalves Canelas

Análise dos efeitos do diclofenac em concentrações ambientalmente realistas em *Hediste diversicolor* através de biomarcadores de *stress* oxidativo e peroxidação lipídica

Faculdade Ciências da Saúde

Universidade Fernando Pessoa

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Porto, outubro de 2018

Gisela Gonçalves Canelas

Análise dos efeitos do diclofenac em concentrações ambientalmente realistas em *Hediste diversicolor* através de biomarcadores de *stress* oxidativo e peroxidação lipídica

Faculdade Ciências da Saúde

Universidade Fernando Pessoa

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Porto, outubro de 2018

**Análise dos efeitos do diclofenac em concentrações
ambientalmente realistas em *Hediste diversicolor* através de
biomarcadores de *stress* oxidativo e peroxidação lipídica**

Discente:

Gisela Gonçalves Canelas

Orientador:

Prof. Doutor Alberto Teodorico Rodrigues Moura Correia (Universidade Fernando Pessoa)

Co-orientador:

Prof. Doutor Bruno André Fernandes de Jesus da Silva Nunes (Universidade de Aveiro)

Trabalho de Pós-Graduação/Dissertação
apresentado à Universidade Fernando
Pessoa como parte dos requisitos para
obtenção de grau de Mestre em Ciências
Farmacêuticas.

Sumário

Vivemos num mundo onde o consumo de fármacos é cada vez mais exacerbado para propósitos de saúde humana e na medicina veterinária, bem como na agricultura e aquacultura. As propriedades intrínsecas inerentes aos fármacos, sobretudo a sua baixa volatilidade e moderada hidrossolubilidade, tornam-se obstáculos à sua remoção pelas estações de tratamento de águas residuais, acabando os mesmos por se acumular no meio aquático. Além disto, os fármacos são continuamente introduzidos no ambiente (pseudo-persistentes), são farmacologicamente potentes e, como agentes recalcitrantes, conservam a sua atividade no meio aquático, atuando em recetores evolutivamente conservados de espécies não-alvo. O grupo de fármacos anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) são dos mais prescritos a nível mundial, e deste grupo destaca-se o diclofenac (DCF), um fármaco usado como analgésico, anti-inflamatório e antipirético. O elevado consumo deste último justifica o facto do mesmo ser encontrado com frequência no compartimento aquático. O DCF é libertado no meio ambiente com elevada frequência, podendo causar danos fisiológicos em organismos selvagens, e também colocar em risco o funcionamento equilibrado de cadeias tróficas. No presente trabalho foram analisados os efeitos ecotoxicológicos do DCF na espécie de poliqueta marinho *Hediste diversicolor*. Indivíduos da referida espécie foram expostos ao DCF num ensaio semi-estático do tipo crónico (28 dias), em concentrações ecologicamente relevantes (0,5, 1 e 2 µg/L). Foram depois quantificados biomarcadores de defesa anti-oxidante – catalase (CAT); de metabolismo de fase II - glutathione S-transferases (GSTs); e de peroxidação lipídica - substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Os resultados deste trabalho demonstram que o DCF não influenciou a atividade da CAT em organismos expostos, no entanto causou um aumento significativo na atividade das GSTs para as concentrações de 1 e 2 µg/L. Além disso a exposição ao DCF causou uma diminuição das TBARS em organismos expostos a todas as concentrações. Os resultados aqui obtidos sugerem que o DCF induziu um cenário de stress oxidativo na espécie *Hediste diversicolor*, embora os mecanismos de proteção ativados tenham prevenido danos membranares.

Palavras-chave: AINE; Catalase (CAT); Glutathione S-Transferases (GST); Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

Abstract

Actually we live in a world where the use of pharmaceuticals for human health, veterinary medicine, agriculture and aquaculture purposes is increasingly exacerbated. The inherent properties of the pharmaceutical drugs, especially their volatility and solubility, become a barrier to their removal by wastewater treatment plants, which makes them to end up in aquatic environment. In addition, drugs are continuously thrown into the environment (pseudo-persistent), are pharmacologically potent and maintain their activity in the aquatic environment, since they are recalcitrant agents acting on evolutionarily conserved receptors of non-target species. Non steroids anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are a group of pharmaceuticals heavily prescribed worldwide, in which DCF stands out for its analgesic, anti-inflammatory and antipyretic use. The high consumption of DCF justifies the fact that it is frequently found in the aquatic environment, endangering non-target species that live there and end up being in permanent contact with it throughout their lifetime, causing them to cause physiological damage and jeopardizing trophic chains. In the present work, the ecotoxicological effects of DCF in *Hediste diversicolor* marine species were analyzed. The species were exposed to DCF in a semi-continuous and chronic assay (28 days) with environmentally realistic DCF concentrations DCF (0.5, 1 and 2 µg/L). Stress oxidative biomarkers were analyzed - Catalase (CAT) e Glutathione S-Transferase (GSTs) - as well as a lipid peroxidation biomarker - Thiobarbituric Acid Reactive Species (TBARS). The results of this work show that DCF does not interfere in CAT activity, but it has increased significantly de GSTs activity for concentrations of 1 and 2 µg/L. As for the TBARS, DCF decreased its activity in all concentrations tested. Therefore, the hereby results suggest that DCF induced an oxidative stress scenario in *Hediste diversicolor* species, but the protective mechanisms activated prevented membrane damage.

Key Words: Ecotoxicology; NSAID; Catalase (CAT); Glutathione S-Transferases (GSTs); Thiobarbituric Acid Reactive Species (TBARS);

Agradecimentos

A conclusão desta tese é um culminar de vários anos de curso, que foi conseguida graças a um conjunto de pessoas que com esforço e dedicação me apoiaram ao longo de todo o processo, e que merecem ser reconhecidas com um enorme agradecimento.

Ao Prof. Doutor Alberto Teodorico Correia pela orientação, paciência e preocupação demonstrada por todo o meu trabalho, por se mostrar sempre disponível e por me dar o apoio necessário para seguir sempre em frente.

Ao Prof. Doutor Bruno Nunes por ser tão prestável e atencioso, pela paciência, disponibilidade e prontidão no esclarecimento de qualquer dúvida, pela sua orientação com os procedimentos laboratoriais dos biomarcadores enzimáticos e tratamento dos respetivos dados para a análise estatística.

Particular agradecimento ao Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental (CIIMAR) e ao Centro de Estudos do Ambiente e do Mar (CESAM) pelo suporte financeiro e logístico que permitiu a realização deste trabalho experimental.

Ao meu grupo de amigos, que me acompanhou ao longo deste período, e ao longo de todo o meu percurso académico, dando-me a força e apoio necessário nesta etapa. E ainda um agradecimento especial à minha colega e amiga Marta Costa, que acompanhou de perto todo este processo e foi o meu maior apoio e motivação para a realização deste trabalho.

À Maria Inês Simões, à Ana Filipa Nogueira e à Inês Pizarro, alunas do professor Bruno, que me acolheram e integraram no CESAM e foram uma grande ajuda na realização do estudo enzimático. Um grande obrigado pelo apoio, disponibilidade, companheirismo e boa energia.

Por fim, aos meus pais Manuel Canelas e Arminda Gonçalves, ao meu irmão, Márcio Canelas, e à minha cunhada, Teresa Gomes, por todos os sacrifícios que fizeram por mim ao longo destes 5 anos, e por todo o apoio e paciência.

Índice

Sumário.....	i
Abstract.....	ii
Agradecimentos	iii
Lista de figuras	vi
Abreviaturas.....	vii
1. Introdução.....	1
1.1 Presença de fármacos no meio aquático	1
1.2 Diclofenac.....	4
1.2.1 Mecanismo de ação	6
1.2.2 Farmacocinética e farmacodinâmica	7
1.2.4 Diclofenac enquanto poluente em compartimentos aquáticos	8
1.3 Uso de biomarcadores	9
1.3.1 Conceitos	9
1.3.2 Biomarcadores de <i>stress</i> oxidativo.....	11
1.3.2.1 Catalase.....	12
1.3.2.2 GSTs	13
1.3.3 Peroxidação Lipídica	13

1.3.3.1	TBARS	13
2	Objetivos.....	15
3	Material e métodos	16
3.2	Organismo de estudo: <i>Hediste diversicolor</i>	16
3.2.4	Coleta, quarentena e exposição da espécie <i>Hediste diversicolor</i> ao diclofenac.....	17
3.3	Quantificação dos biomarcadores.....	18
3.3.1	Preparação das amostras	18
3.3.2	Quantificação da atividade da enzima catalase	18
3.3.3	Quantificação da atividade das isoenzimas GSTs	19
3.3.4	Quantificação TBARS	19
3.3.5	Quantificação da proteína total.....	19
3.3.6	Análise Estatística	20
4	Resultados.....	20
4.1	Catalase.....	20
4.2	GSTs	21
4.3	TBARS	22
5.	Discussão.....	23
6.	Conclusões.....	26
7.	Referências bibliográficas	28

Lista de figuras

Fig. 1 – Percentagens das classes terapêuticas encontradas no meio ambiente. Dados recolhidos de 134 artigos no período de 1997 até 2009. Adaptado de Santos <i>et al.</i> (2010).....	4
Fig. 2 – Estrutura química do diclofenac. Fonte: https://www.ncbi.nlm.nih.gov . (Consultado em: 20/08/2018).....	5
Fig. 3 - Processo de peroxidação lipídica. Adaptado de Sachdeva <i>et al.</i> (2014).....	17
Fig. 4 - Reação entre MDA e TBA. Adaptado de Grotto <i>et al.</i> (2009).....	18
Fig. 5 - Atividade da enzima CAT em indivíduos de <i>Hediste diversicolor</i> expostos de forma crónica (28 dias) a diferentes concentrações de DCF. Valores correspondentes a três réplicas \pm erro padrão.....	23
Fig. 6 – Atividade das enzimas GSTs em indivíduos de <i>Hediste diversicolor</i> expostos de forma crónica (28 dias) a diferentes concentrações de DCF. Valores correspondentes a três réplicas \pm erro padrão.....	24
Fig. 7 – Atividade TBARS em indivíduos de <i>Hediste diversicolor</i> expostos de forma crónica (28 dias) a diferentes concentrações de DCF. Valores correspondentes a três réplicas \pm erro padrão.....	25

Abreviaturas

AINE – Anti-Inflamatório Não Esteroide

CAT – Catalase

CDNB – 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno

COX – Cicloxigenases

DCF – Diclofenac

ERO – Espécies Reativas ao Oxigénio

ETAR – Estação de Tratamento de Águas Residuais

GI – Gastrointestinal

GRed – Glutathiona redutase

GSH – Glutathiona Reduzida

GSTs – Glutathiona-S-Transferases

HNE – 4-hydroxy-2-nonenal

MDA – Malondialdeído

PGs – Prostaglandinas

PGI₂ – Prostaciclina

TBA – Ácido Tiobarbitúrico

TBARS – Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

1. Introdução

1.1 Presença de fármacos no meio aquático

O aumento acentuado do consumo de fármacos nos últimos anos, tem levado a uma crescente preocupação da comunidade científica sobre os perigos para a saúde humana e ambiental (Corcoran *et al.*, 2010, Pereira *et al.*, 2016). Estas características diferem de fármaco para fármaco e resultam necessariamente em diferentes perfis de exposição ambiental (Pereira *et al.*, 2016). De modo geral, os fármacos estão constantemente a ser introduzidos no ambiente, fazendo com que os mesmos de mantenham neste meio por longos períodos de tempo (Costa *et al.*, 2008). Estes compostos apresentam elevada lipofilia, o que lhes permite atravessar membranas biológicas e serem prontamente absorvidos; apresentam também alguma resistência à biotransformação como meio de prolongar o tempo de efeito terapêutico (Nunes, 2011). Estas características justificam a persistência dos compostos farmacêuticos no meio ambiente, uma vez que os tornam resistentes aos processos de eliminação pelas estações de tratamento de águas residuais (ETARs) (Nunes, 2011). Além das características mencionadas, os fármacos podem passar por processos de biotransformação, dos quais resultam metabolitos cuja toxicidade pode diferir na molécula original, e têm ainda capacidade de interação com outros fármacos e metabolitos por sinergia, antagonismo ou efeito de adição (Halling-Sørensen *et al.*, 1998, Cleuvers, 2003).

Este tipo de poluição, e particularmente a poluição do meio aquático, passou a ser mais reconhecida a partir dos anos 90, após um desenvolvimento de técnicas químicas analíticas com limites de deteção menores e que permitiram determinar que os resíduos farmacêuticos não são completamente eliminados durante os tratamentos (Daughton e Ternes, 1999, Löffler *et al.*, 2005, Santos *et al.*, 2010). Hoje em dia podemos considerar os fármacos como poluentes emergentes, pois estão constantemente a ser lançados no meio ambiente e aí permanecem por dias, meses ou anos, podendo afetar organismos que estão em permanente contacto consigo, e causar-lhes danos, mesmo quando presentes em concentrações vestigiais (Maranho *et al.*, 2015).

Os compostos farmacológicos são criados com o propósito maximizar o mecanismo de ação nos animais e humanos. No entanto, quando libertados no meio terrestre ou

aquático podem ter efeitos negativos nos sistemas metabólicos de organismos não-alvo, que podem ter recetores análogos nos quais esses fármacos atuam (Daughton e Ternes, 1999). Estes organismos não-alvo podem estar particularmente sujeitos aos efeitos dos fármacos por não possuírem sistemas metabólicos, desintoxicantes e excretores ao contrário dos organismos-alvo, como os humanos (Arnold *et al.*, 2014). Os mesmos são ainda responsáveis por fenómenos de bioacumulação e efeitos tóxicos nos organismos aquáticos, por serem lipofílicos, tal como outros xenobióticos (Santos *et al.*, 2010, Meredith-Williams *et al.*, 2012).

Os fármacos atravessam as membranas celulares através de mecanismos de transporte como difusão simples, difusão facilitada, transporte ativo ou pinocitose, dependendo da sua polaridade, sendo que fármacos não polares atravessam as membranas celulares facilmente por difusão passiva (Peck *et al.*, 2008, Verma e Stellacci, 2010). Desta forma, os compostos farmacológicos conseguem chegar às células, tecidos ou órgãos para os quais têm afinidade e atuam sobretudo em enzimas, recetores, canais e transportadores de moléculas e apesar de serem desenhados para exercerem um efeito em seres humanos, podem executar o mesmo efeito nas espécies aquáticas que apresentam recetores em comum (Corcoran *et al.*, 2010). No entanto, os efeitos causados nestas espécies não-alvo podem ser inesperados em relação aos efeitos farmacológicos que ocorrem em humanos, até porque algumas espécies aquáticas apresentam uma capacidade menor para metabolizar xenobióticos (Brausch *et al.*, 2012). Um exemplo disso mesmo é o facto de que, no meio ambiente, os fármacos podem causar alterações do sistema microsomal hepático, ou isoenzimas do sistema Citocromo P450, e consequentemente em todas as vias enzimáticas mediadas pelo mesmo, resultando em toxicidade e efeitos a nível fisiológico (Burkina *et al.*, 2013).

Os fármacos são administrados, metabolizados e posteriormente excretados e, na maioria dos casos, seguem, para redes de tratamento de águas residuais, que são no entanto muitas das vezes ineficazes (Lonappan *et al.*, 2016), permitindo que os seus resíduos (substância original ou metabolitos) sejam libertados nas águas de superfície, nas águas subterrâneas e/ou no solo (Li, 2014). Para além desta via, os fármacos podem também chegar ao ambiente através dos efluentes provenientes das indústrias farmacêuticas, e pela eliminação de medicamentos fora de uso ou cujo prazo de validade

expirou (Hester e Harrison, 2015). É de referir ainda que fármacos de uso veterinário são libertados diretamente para o ambiente e podem também tornar-se contaminantes, quando usados na aquacultura ou agropecuária (Fent *et al.*, 2006, Zhang *et al.*, 2008). Fármacos com maior hidrofília podem chegar ao meio ambiente, nomeadamente a águas superficiais, através dos efluentes domésticos, industriais e hospitalares, enquanto fármacos com maior lipofília apresentam risco de poluição para águas mais profundas, e estão maioritariamente relacionados com a área agrícola e excreções dos animais (Beausse, 2004).

Quando libertados no ambiente, os fármacos podem encontrar-se na sua forma original ou sob a forma de metabolitos, ativo ou não. No entanto, já no meio ambiente, os mesmos podem ainda ser degradados ou sofrer alterações ao serem completa ou parcialmente transformados em moléculas parentais, por processos não bióticos, como hidrólise e fotólise, e bióticos, nomeadamente a sua biotransformação por bactérias e fungos constituintes da microflora da água (Kosjek *et al.*, 2007, Kummerer, 2009, Santos *et al.*, 2010). Estas moléculas parentais podem apresentar uma maior estabilidade e maior capacidade de bioacumulação que o composto original, podem apresentar também uma maior toxicidade, e ainda adquirir novas características e propriedades farmacológicas (Zuccato *et al.*, 2000, Kosjek *et al.*, 2007, Kummerer, 2009).

Os fármacos em geral são encontrados em vários compartimentos aquáticos, como lagos, rios, estuários, água do mar e nos sedimentos aquáticos, e também na água de consumo e águas subterrâneas (Fent *et al.*, 2006, Santos *et al.*, 2010, Maranhão *et al.*, 2014). A classe terapêutica dos anti-inflamatórios não esteroides (AINEs), por exemplo, encontra-se no meio aquático em concentrações que variam entre 0,01 ng/L e 2,4 µg/L e, em sedimentos, as concentrações encontradas variam de 0,1 ng/g a seco, até 840 µg/L, a húmido (Fabbri e Franzellitti, 2016). Embora estas concentrações sejam, de modo geral, baixas e subletais, ao longo do tempo podem afetar vertebrados e invertebrados que aqui habitam (Santos *et al.*, 2010).

Os fármacos mais encontrados no meio aquático, enquanto poluentes, coincidem com as classes de fármacos mais usados, sendo eles AINEs, antibióticos, redutores de colesterol, hormonas sexuais e antidepressivos (Corcoran *et al.*, 2010, Santos *et al.*,

2010). Do grupo dos AINEs são encontrados com regularidade, em efluentes e águas de superfície, diclofenac, ibuprofeno, naproxeno, cetoprofeno e indometacina (Corcoran *et al.*, 2010, Brausch *et al.*, 2012).

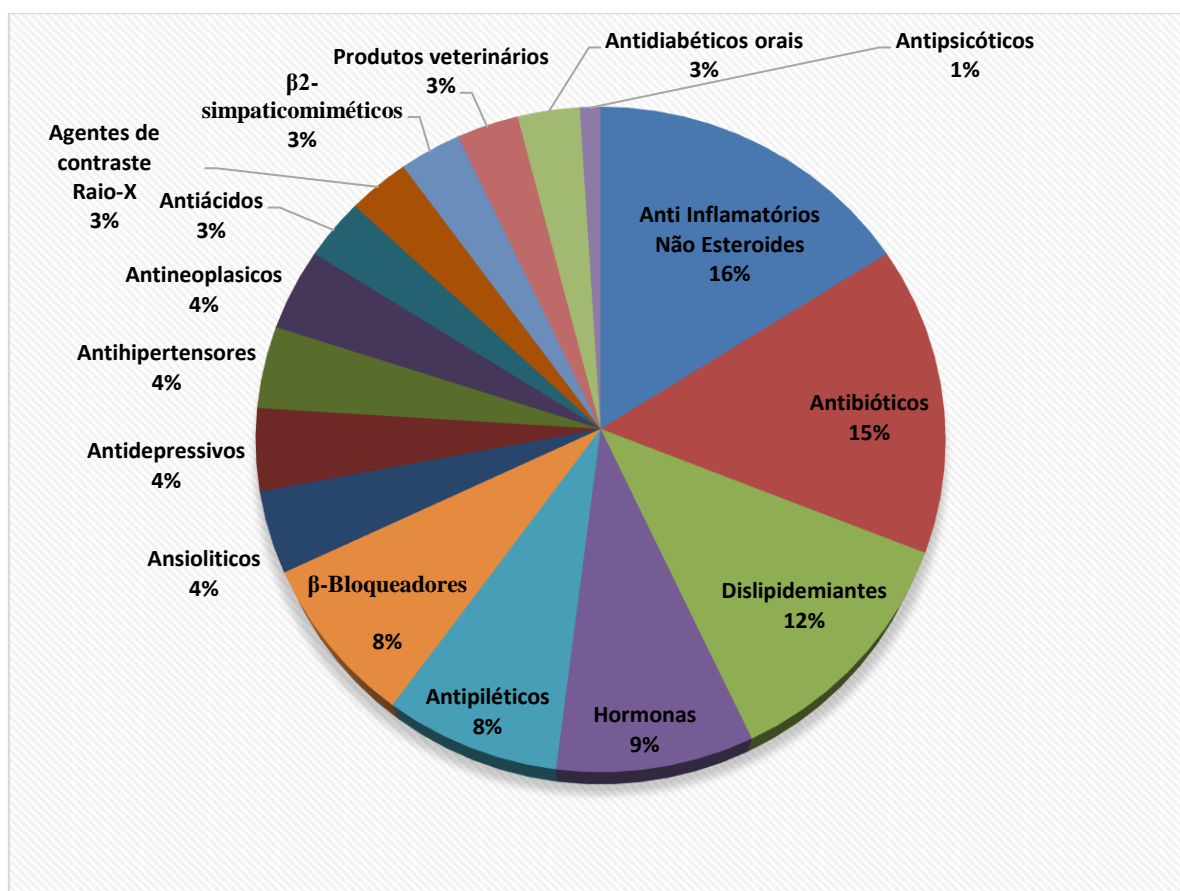


Fig. 1 - Percentagens das classes terapêuticas encontradas no meio ambiente. Dados recolhidos de 134 artigos no período de 1997 até 2009. Adaptado de Santos *et al.* (2010)

1.2 Diclofenac

O Diclofenac (DCF) (2-(2-((2,6-diclorofenil)amino)fenil)acetico) (Saraf, 2008) é um AINE que foi introduzido no mercado em 1974, no Japão (Skoutakis *et al.*, 1988, Gan, 2010).

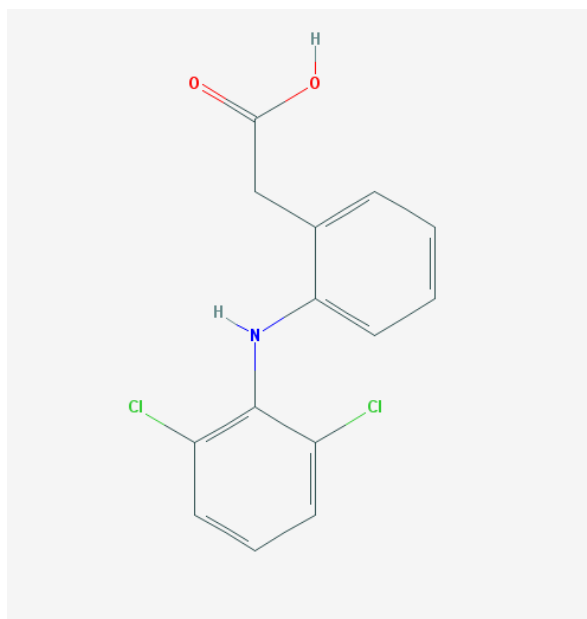


Fig. 2 - Estrutura química do diclofenac. Fonte: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>. (Consultado em: 20/08/2018)

Este fármaco é muito prescrito em todo o mundo tendo em conta as suas propriedades anti-inflamatórias, analgésicas e antipiréticas, para além de tratar a dor crónica e aguda. Está disponível nas formas oral, retal, intravenosa, transdérmica e tópica (Gan, 2010). É usado em situações de artrite reumatóide, osteoartrose, bursite, edema, alívio da dor e ainda no tratamento de espondilite (Gaikwad, 2017). A nível de medicina veterinária, o DCF está indicado no tratamento de animais como um complemento em cirurgia de cataratas, para tratamento de uveítes e irites, para situações de dor e inflamação relacionada com cirurgias da córnea e também no tratamento de queratite ulcerativa, caso os corticosteroides estejam contraindicados (Ramsey, 2011).

Quimicamente, o DCF é um ácido fenilacético com pH de 4 (ácido fraco) e tem um coeficiente de partição de 13,4, ou seja, é parcialmente solúvel tanto em meio hidrófilo como hidrofóbico. Quanto à sua estrutura molecular, este tem um grupo ácido fenilacético e um anel fenilo com dois átomos de carbono, o que lhe confere uma capacidade de torção máxima e permite que o mesmo se ligue ao substrato da enzima COX (Altman *et al.*, 2015).

1.2.1 Mecanismo de ação

As cicloxigenases (COX) são enzimas responsáveis por mediar a síntese das prostaglandinas (PGs) a partir do ácido araquidônico. As PGs participam em vários processos fisiológicos como a regulação da homeostase vascular, função renal, entre outras. Estas são também responsáveis pela ocorrência de dor e estados febris, acompanhados de processos inflamatórios (Saraf, 2008).

As COX existem em duas isoformas: COX-1 e COX-2. A COX-1 tem função constitutiva e está presente em vários tecidos, como a mucosa gástrica, intestinos e rins, onde é responsável pela produção de PGs. As COX-1 não parecem, no entanto, estar envolvidas nos processos inflamatórios (Saraf, 2008). Por outro lado, as COX-2 são enzimas indutíveis que se encontram em níveis bastante baixos nos tecidos mas cuja expressão aumenta significativamente quando ocorrem danos teciduais e na presença de mediadores pró-inflamatórios como macrófagos, fibroblastos e células do líquido sinovial, e o aumento da sua expressão promove um aumento na produção de prostaglandinas, tromboxano e leucotrienos (Simon, 2001, Saraf, 2008, Gan, 2010). Esta isoenzima é ainda expressa a nível constitutivo nos ossos, cérebro, rins e no sistema reprodutivo feminino (Simon, 2001, Tarr e Reuter, 2015)

O principal mecanismo de ação do DCF, e o mais conhecido, é a inibição das cicloxigenases (COX-1 e COX-2). Sem este mediador o ácido araquidônico não é transformado em PGs, o que se traduz na função anti-inflamatória, antipirética e analgésica inerente ao fármaco (Saraf, 2008). No entanto, o diclofenac difere dos outros AINE por ter maior afinidade para a COX-2 do que para a COX-1 que os demais existentes (Gan, 2010, Altman *et al.*, 2015). Uma inibição mais seletiva da COX-2 traz vantagens na medida que há interferência na produção de PGs especificamente envolvidas na inflamação, enquanto a produção das PGs via COX-1, responsáveis por um funcionamento normal dos tecidos, é menos afetada (Saraf, 2008). Mais ainda, uma inibição específica das COX-2 atua na dor e inflamação, sem que ocorram os efeitos adversos respetivos a uma atuação a nível da COX-1 (caraterísticas de um AINE comum, que atua nas duas vias) como toxicidade a nível do trato gastrointestinal superior e rins (Simon, 2001). No entanto, por outro lado, sendo as COX-2 as responsáveis pela

produção de prostaciclina (PGI₂), envolvidas no metabolismo do ácido araquidônico nas células endoteliais vasculares, a sua inibição pode resultar em hipertensão e trombooses (Altman *et al.*, 2015).

1.2.2. Farmacocinética e farmacodinâmica

O DCF sofre, então, extensa metabolização hepática pelo Citocromo P450 (Davies e Anderson, 1997). Da fase I, de hidroxilação, resultam os seus metabolitos: 3'-hidroxi-diclofenac, 4'-hidroxi-diclofenac, 3'-hidroxi-4'-metoxi-diclofenac e 4',5-dihidroxi-diclofenac (Davies e Anderson, 1997). O metabolito mais abundante, 4'-hidroxi-diclofenac, tem uma fraca atividade anti-inflamatória e analgésica quando comparada com o original (Todd e Sorkin, 1988), contudo a sua atividade biológica é significativa, sobretudo porque representa cerca de 30-40% do total de produtos resultantes da biotransformação (Skoutakis *et al.*, 1988). No metabolismo de fase II ocorre a conjugação dos produtos com ácido glucorónico e/ou sulfato (Brogden *et al.*, 1980). A eliminação do fármaco é proporcionada pela metabolização e consequente excreção dos conjugados glucorónicos e sulfatados (Todd e Sorkin, 1988). A excreção do fármaco e dos seus metabolitos ocorre pela via renal, biliar e nas fezes, sendo que a principal via é a renal, em que os conjugados são eliminados na urina (Davies e Anderson, 1997).

Os peixes metabolizam o DCF por uma via semelhante à humana, uma vez que, em peixes, há evidência da existência de um sistema citocromo P450, nomeadamente o CYP1A1, que é uma enzima de biotransformação induzida aquando poluição ambiental (Goksøyr e Förlin, 1992). Também há evidência de atividade enzimática P450 em invertebrados aquáticos, nomeadamente em artrópodes (crustáceos), anelídeos (poliquetas), cnidários, moluscos, poríferos, platelmintos e equinodermos (Snyder, 2000).

Quanto aos efeitos tóxicos no ambiente, o DCF começou por chamar a atenção da comunidade científica enquanto poluente ambiental quando há cerca de 15 anos atrás numa população de abutres mostrou efeitos deletérios sobre mesma, provocando falha renal fulminante e gota visceral, resultando na diminuição do efetivo populacional (Oaks *et al.*, 2004). A partir daí surgiram outros estudos a nível aquático para avaliar o risco neste ecossistema (Cleuvers, 2004, Gros *et al.*, 2010, Schwarz *et al.*, 2017).

1.2.4 Diclofenac enquanto poluente em compartimentos aquáticos

Um estudo conduzido pela Intercontinental Marketing Services (IMS) estimou que o consumo anual de DCF ronda as 940 toneladas a nível global (Zhang *et al.*, 2008). Sendo um fármaco de elevado consumo é necessário estudar o seu destino, identificando-o como poluente e percebendo quais os danos colaterais no meio ambiente provenientes desta mesma contaminação. Este é já considerado um dos fármacos que mais frequentemente se encontra em meio aquático (Schwaiger *et al.*, 2004), tendo sido encontrado o DCF na sua forma original, mas também como metabolito nomeadamente como 3'-OH-DCF e 4'-OH-DCF, resultantes da metabolização humana (Vieno e Sillanpää, 2014), e radicais hidroxilo, resultantes da sua fotólise (Schmitt-Jansen *et al.*, 2007).

A sua presença no meio aquático não é causada apenas pelo seu elevado consumo mas também pelo facto de que este não é assimilado por completo nos humanos, e ainda pelo facto dos tratamentos nas ETAR se revelarem ineficientes (Acuña *et al.*, 2015). O DCF é muito usado para aplicação na pele, no entanto estima-se que apenas que apenas 5 a 10% seja efetivamente absorvido por esta via, sendo os restantes 90 a 95% eliminados diretamente na água quando as pessoas lavam a zona em tratamento (Letzel *et al.*, 2009). Este dado é importante porque se estima que os principais resíduos nas águas municipais provenham exatamente desta via de tratamento (Heberer e Feldmann, 2005). Importante será também referir que vários estudos estimam que a remoção do DCF nas estações de tratamento de água ronda valores de 0% (Soulet *et al.*, 2002, Strenn *et al.*, 2004, Tauxe-Wuersch *et al.*, 2005), e outros relatam valores de remoção parciais entre 20-75% (Gómez *et al.*, 2007, Joss *et al.*, 2005, Stumpf *et al.*, 1999). Por um lado considera-se o DCF um poluente não persistente, por sofrer fotólise rapidamente e assim não permanecer muito tempo na água e dar origem a outros compostos no ambiente (Bartels e Tümpling, 2007, Lee *et al.*, 2011). No entanto a sua constante libertação para o meio aquático faz com que o mesmo seja na realidade considerado um poluente “pseudo-persistente”, ao qual as espécies no meio aquático permanecem em contacto por longos períodos de tempo (Ferrari *et al.*, 2003, Ort *et al.*, 2009, Acuña *et al.*, 2015).

No meio aquático, estudos apontam para que o DCF se encontra a uma concentração de 0,81 µg/L em efluentes de estações de tratamento de águas (Ternes, 1998, Schwaiger *et al.*, 2004), podendo chegar a valores que rondam os 2 µg/L em efluentes de estações de tratamento de águas e em águas de superfície (Schwaiger *et al.*, 2004, Guiloski *et al.*, 2015), o que, embora não sejam concentrações elevadas, podem, a longo prazo, causar danos biológicos nos seres vivos em contacto com este poluente (Corcoran *et al.*, 2010). O DCF foi encontrado em rios, lençóis freáticos, efluentes hospitalares e água de consumo (Buser *et al.*, 1998, Ollers *et al.*, 2001, Kim *et al.*, 2007, Stülten *et al.*, 2008, Letzel *et al.*, 2009, Metcalfe *et al.*, 2009, Santos *et al.*, 2010).

O DCF parece causar interferências a nível endócrino e reprodutivo (Hong *et al.*, 2007, Lee *et al.*, 2011, Guiloski *et al.*, 2015), toxicidade a nível celular (Triebkorn *et al.*, 2004, Parolini *et al.*, 2011) e indução de *stress* oxidativo (Quinn *et al.*, 2011, Guiloski *et al.*, 2017).

1.3 Uso de biomarcadores

1.3.1 Conceitos

O uso de biomarcadores permite-nos detetar alterações nas respostas biológicas de um individuo relacionadas com a exposição subletal a compostos tóxicos. São avaliações em biomoléculas, sistemas enzimáticos, células ou tecidos de organismos expostos a um poluente e que nos levam a detetar desvios em relação ao que é considerado normal (Oost *et al.*, 2003, Hyne e Maher, 2003, Jesus e Carvalho, 2008). O uso de biomarcadores tem particular interesse por permitir ainda verificar atempadamente os efeitos de determinado poluente, de forma a que possam ser tomadas medidas mitigadoras, sem que se tenha de esperar longos períodos de tempo até que se verifiquem os danos causados, que serão nessa altura irreversíveis (Oost *et al.*, 2003).

Os estudos que utilizam biomarcadores podem ser feitos recorrendo a ensaios em laboratório, o que facilita o estabelecimento de relações causa-efeito ou dose-efeito, muito úteis em diagnósticos clínicos (Amorim, 2003, Hyne e Maher, 2003), mas também a ensaios *in situ* que avaliam os processos dinâmicos ocorridos em ambiente aquático e tendem a ser mais realistas (Magalhães e Filho, 2008). Podem também ser feitos estudos de biomonitorização, recorrendo a organismos mantidos em campo, para prever a

existência de substâncias tóxicas na água, avaliando parâmetros fisiológicos ou comportamentais (Magalhães e Filho, 2008).

“Biomarcador” pode ser definido como uma ferramenta que possibilita a medição da exposição a um agente tóxico, a amplitude da resposta ao mesmo e permitem também prever uma possível resposta decorrente deste tipo de exposição. Permitem, portanto, detetar riscos para a saúde decorrentes da exposição a um xenobiotico (Timbrell, 1998).

Os biomarcadores podem ser subdivididos em 3 subcategorias (WHO, 1993, Amorim, 2003), nomeadamente:

- a) *Biomarcadores de exposição*: O bioindicador usado dá-nos indicação acerca da dose de poluente absorvido (face à dose externa presente no meio ambiente) ao quantificarmos o poluente em questão ou seus metabolitos e/ou derivados em células, tecidos, fluídos biológicos, entre outros. Estes permitem verificar e avaliar a exposição de indivíduos a determinado poluente e estabelecer, assim, uma relação entre a exposição externa e a quantificação do mesmo a nível interno.
- b) *Biomarcadores de efeito*: Trata-se da avaliação quantitativa de um parâmetro biológico no organismo resultante da interação da substância a ser avaliada com recetores biológicos. Os biomarcadores eleitos são os envolvidos em mecanismos de toxicidade e são usados em componentes de identificação de perigos, bem como da avaliação dose-resposta quando se pretende avaliar o risco.
- c) *Biomarcadores de suscetibilidade*: cada individuo apresenta suscetibilidade variável a diferentes substâncias, o que está relacionado com fatores genéticos ou adquiridos. Este tipo de biomarcador indica a capacidade de um organismo responder à exposição a um agente tóxico.

No entanto, esta divisão pode ser vista como demasiado simplificada, uma vez que existem biomarcadores que se encaixem em mais do que uma classificação e outros que não encaixem em nenhuma. Assim sendo existem autores que sugerem um modo diferente para qualificar os biomarcadores, de acordo com a sua função fisiológica ou funcional, originando várias subdivisões mais específicas (Peakall, 1992, Oost *et al.*, 2003). Os biomarcadores usados com maior frequência são: a) enzimas de biotransformação; b) parâmetros de *stress* oxidativo; c) produtos de biotransformação; d)

proteínas de *stress*, metalotioneínas e de resistência a multixenobióticos; e) parâmetros hematológicos; f) parâmetros imunológicos; g) parâmetros reprodutivos e endócrinos; h) parâmetros neuromusculares; i) parâmetros genotóxicos; j) parâmetros fisiológicos e morfológicos; e k) alterações comportamentais (Oost *et al.*, 2003).

1.3.2 Biomarcadores de *stress* oxidativo

As espécies reativas de oxigénio (ERO) englobam o conjunto de radicais livres provenientes do metabolismo do oxigénio molecular, de entre os quais se encontram o anião superóxido (O_2^-), radical hidroxilo (HO), e são ainda usados como termo para outras como o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) que não sendo radicais, são igualmente altamente reativos (Aruoma, 1998, Turrens, 2003, Ray *et al.*, 2012).

Os danos provocados pela produção de ERO nas células são prevenidos pelos sistemas antioxidantes presentes no organismo (Turrens, 2003). No entanto quando a formação de ERO se sobrepõe às defesas antioxidantes ocorre o chamado *stress* oxidativo, que se reflete em problemas no sistema de desintoxicação e, conseqüentemente, na proteção das células (Wiegand *et al.*, 2000, Turrens, 2003, Ray *et al.*, 2012), podendo inclusive levar à morte celular (Ott *et al.*, 2007). Este processo pode dever-se a questões endógenas, nomeadamente aos compostos produzidos na respiração celular, ou a questões exógenas, quando há, por exemplo, contacto com xenobióticos (Giulio *et al.*, 1989, Turrens, 2003, Ray *et al.*, 2012). As diversas classes de xenobióticos são, de facto, uma grande fonte de produção de radicais de oxigénio, por serem facilmente reduzidos aos seus radicais quando sujeitos ao ciclo redox (Giulio *et al.*, 1989). No ciclo redox, o xenobiótico é reduzido a um composto intermediário reativo, pelas isoenzimas do citocromo P450, que perde facilmente um eletrão para o oxigénio molecular, dando origem ao radical superóxido e outras ERO. Os compostos que se formam podem ser, então, novamente submetidos a um ciclo redox (Winston e Giulio, 1991). Quando a produção de ERO, proveniente do metabolismo dos xenobióticos, se sobrepõe a capacidade de proteção oferecida pelos compostos antioxidantes, ocorrem danos oxidativos, mais precisamente danos em macromoléculas e células, ou seja, em lípidos, proteínas e DNA que podem originar proliferação celular e, conseqüentemente, formação

de tumores, desencadeamento de processos inflamatórios e aceleração do processo de envelhecimento (Giulio *et al.*, 1989, Schieber e Chandel, 2014).

Os sistemas de defesa que os organismos possuem contra estas ERO, como defesas antioxidantes, não permitem que a concentração das mesmas aumentem muito, exercendo assim função de proteção celular (Yang *et al.*, 2012).

Estes tipos de defesa podem ser enzimáticos ou não enzimáticos. Antioxidantes não enzimáticos incluem compostos como ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E), glutathiona reduzida (GSH) e β -Caroteno (López-Torres *et al.*, 1993, Birben *et al.*, 2012), enquanto dos antioxidantes enzimáticos incluem a Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT), Peroxidase (Px) e Glutathiona Redutase (GRed) (Huggett *et al.*, 1992, Birben *et al.*, 2012).

1.3.2.1 Catalase

A Catalase (CAT) é uma enzima citoplasmática com função de defesa antioxidante primária, e, portanto, protetora que se baseia na sua capacidade de transformar peróxidos e superóxidos em espécies não tóxicas (Wheeler *et al.*, 1990, Winston *et al.*, 1990).

Esta enzima tem duas funções, nomeadamente função catalítica, que se traduz na decomposição do peróxido de hidrogénio (H_2O_2) em água (H_2O) e oxigénio molecular (O_2), dependente de NADPH, sendo esta a que ocorre em meio fisiológico durante o metabolismo basal ou após contato com um poluente; e função peroxidativa, em que ocorre oxidação de compostos hidrogenados (metanol, etanol, etc) (Aebi, 1984, Wheeler *et al.*, 1990, Winston *et al.*, 1990). Ambas as reações têm em comum a formação de um composto intermediário (Aebi, 1984).

A CAT encontra-se nos organismos que se desenvolvem na presença de oxigénio, normalmente dentro de estruturas subcelulares, como nos peroxisomas das células do fígado e rins, isto porque é aqui que se encontram muitas das enzimas que originam H_2O_2 tais como glicolato oxidase ou flavoproteínas desidrogenase (Khessiba *et al.*, 2005).

1.3.2.2 GSTs

As glutathiona-s-transferases (GSTs) englobam um conjunto de isoenzimas de fase II, envolvidas da desintoxicação e excreção tanto de substâncias endócrinas como de xenobióticos (Wilce e Parker, 1994, Trute *et al.*, 2007), incluindo compostos farmacologicamente ativos (Habig *et al.*, 1974), sendo que algumas delas atuam têm função antioxidante através da inativação de metabólitos secundários, como aldeídos insaturados, epóxidos e hidroperóxidos (Trute *et al.*, 2007, Birben *et al.*, 2012). Estas isoenzimas são também responsáveis pelo transporte intracelular de determinados componentes como bilirrubina ou componentes do grupo heme (Tew e Ronai, 1999).

As GSTs estão maioritariamente presentes no fígado e têm um papel importante no combate ao *stress* oxidativo e danos associados, uma vez que catalisam a conjugação de compostos eletrofílicos com a glutathiona reduzida (GSH) (Halliwell e Gutteridge, 2015). Os compostos conjugados de glutathiona vão apresentar maior solubilidade em água e, como tal, vão ser mais facilmente excretados na urina (Wilce e Parker, 1994, Halliwell e Gutteridge, 2015). Esta conjugação com a GSH é, normalmente o primeiro passo na eliminação de um xenobiótico, no entanto os produtos resultantes podem ser também prejudiciais e causar dano renal (Halliwell e Gutteridge, 2015).

1.3.3 Peroxidação Lipídica

1.3.3.1 TBARS

O oxigénio exerce efeitos tóxicos sobre elementos celulares, sobretudo nos ácidos gordos polinsaturados, que se encontram nas membranas celulares e lipoproteínas (Lima e Abdalla, 2001). O processo de oxidação é mediado pelos radicais livres, nomeadamente espécies reativas de oxigénio e espécies reativas de nitrogénio e é designado de peroxidação lipídica (LPO) (Lima e Abdalla, 2001). Este processo acarreta consequências ao nível da membrana celular, diminuindo a sua fluidez e potencial de membrana e aumentando a sua permeabilidade, podendo até causar a sua rutura. Para além disto é de salientar que os produtos daqui provenientes podem apresentar citotoxicidade. Assim sendo, os biomarcadores de LPO têm muita importância pois, um aumento da mesma é um sinal de alerta para doenças ou tecidos sujeitos a *stress* oxidativo (Gutteridge, 1995).

A LPO ocorre em 3 etapas, nomeadamente iniciação, propagação e término (Fig. 3). Inicialmente é formado um radical alquilo resultante do ataque de uma espécie reativa aos ácidos gordos polinsaturados, que lhes retira um átomo de hidrogénio de um grupo metileno. Em meio aeróbico o grupo alquilo (radical lipídico com carbono no centro) liga-se a uma molécula de oxigénio e transforma-se num radical peroxilo. Os radicais peroxilo tanto se podem combinar entre si como atacar membranas proteicas, mas são também capazes de remover hidrogénio de outras cadeias de ácidos gordos polinsaturados dando, assim, origem à propagação do processo de LPO (Halliwell e Chirico, 1993, Lima e Abdalla, 2001).

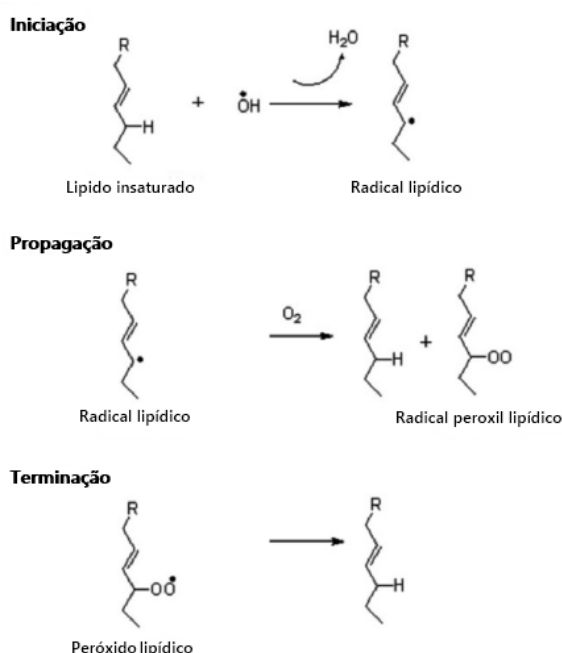


Fig. 3 - Processo de peroxidação lipídica. Adaptado de Sachdeva *et al.* (2014)

O radical peroxilo reage depois com o átomo de hidrogénio que removeu dando origem a um hidroperóxido lipídico. Este último pode ainda reagir com metais de transição, como Ferro (Fe) e Cobre (Cu), ou quelatos desses metais, dando origem a radicais lipídicos (Halliwell e Chirico, 1993, Lima e Abdalla, 2001). Numa fase final os radicais formados reagem entre si e são, desta forma, neutralizados (Lima e Abdalla, 2001).

Do processo referido resultam hidroperóxidos lipídicos e aldeídos. Estes últimos são também bastante reativos e podem amplificar os eventos causados pelos radicais livres

(Catalá, 2006). Os aldeídos mais estudados, são 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) e malondialdeído (MDA), sendo este último o mais abundante produto da LPO (Catalá, 2006).

O MDA ataca resíduos de aminoácidos, especialmente da lisina, a pH baixo, e ataca também as cabeças amina de fosfolípidos, como fosfatidilserina e fosfatidiletanolamina (Uchida, 1999, Halliwell e Gutteridge, 2015). O MDA pode ainda reagir com bases de DNA, especialmente a guanina, e com agentes nucleófilos, produzindo compostos fluorescentes no espectro visível (Lima e Abdalla, 2001, Halliwell e Gutteridge, 2015).

A quantificação de MDA é dos métodos mais usados para avaliar a existência de peroxidação lipídica, este método é designado por Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) e é consequência da capacidade que o MDA tem para reagir com o ácido tiobarbitúrico (TBA) (Lima e Abdalla, 2001) (Fig. 4).

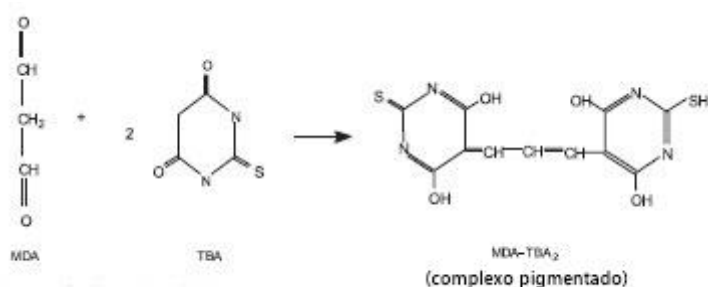


Fig. 4 - Reação entre MDA e TBA. Adaptado de Grotto *et al.* (2009)

2 Objetivos

O objetivo deste trabalho foi determinar experimentalmente os efeitos ecotoxicológicos resultantes da exposição crónica (28 dias) da espécie de poliqueta marinha e estuarina *Hediste diversicolor* a concentrações de diclofenac já encontradas no seu meio ambiente (0,5 µg/L, 1 µg/L e 2 µg/L), recorrendo a biomarcadores de *stress* oxidativo (CAT e GSTs) e peroxidação lipídica (TBARS).

3 Material e métodos

3.2 Organismo de estudo: *Hediste diversicolor*

Hediste diversicolor (O. F. Müller, 1776) pertence à família Nereididae, da ordem Phyllodocida (Scaps, 2002).

Esta espécie de poliqueta está presente em águas salgadas e salobras, na Europa e na costa norte americana do Atlântico, e habita normalmente em zonas de lamas arenosas, mas também em cascalho, argilas e relva (Scaps, 2002). São organismos omnívoros, alimentando-se tanto de matéria de origem vegetal como animal, presentes à superfície dos sedimentos (Fish e Fish, 1989). Entre as suas características destacam-se a sua resistência a variações de temperatura e de salinidade, bem como a ambientes anaeróbios (Scaps, 2002). Embora as suas larvas possam ser transportadas a longas distâncias, os adultos são relativamente imóveis e, como tal, são expostos de forma crónica a qualquer composto e/ou poluente no seu ambiente (Dean, 2008).

Esta é considerada, portanto, uma espécie-chave no funcionamento dos ecossistemas estuarinos, pelo que tem sido usada em vários estudos pelas inerentes características biológicas e ecológicas (Moreira *et al.*, 2006, Bouraoui *et al.*, 2009, Buffet *et al.*, 2011). Entre estas, destacam-se a sua resistência à poluição aquática, o facto de estarem presentes em zonas aquáticas muito eutrofizadas, como sejam estuários ricos em zinco e cobre, que fazem de si bons representantes da fauna bentónica (Gillet *et al.*, 2008, Obolewski *et al.*, 2009). Têm também grande importância ecológica porque servem de alimento a peixes e aves, desta forma, podem transferir os compostos poluentes para os níveis tróficos superiores (Kalman *et al.*, 2009, Obolewski *et al.*, 2009, Aberson *et al.*, 2016).

Este invertebrado permite-nos obter informação acerca da qualidade dos sedimentos por estar em constante contacto com os mesmos, bem como os seus possíveis contaminantes, e para além de serem muito numerosos, são fáceis de capturar e manter em laboratório (Maranho *et al.*, 2015). Esta espécie de poliqueta é considerada uma excelente espécie para ensaios de toxicidade por estar bem estudado relativamente às suas características biológicas e ecológicas, fazendo com que os resultados sejam mais fáceis de interpretar, é tolerante a um largo gradiente de concentração de salinidade e de

temperatura, além de que está disponível comercialmente por ser frequentemente usado como isca para pesca (Catalano *et al.*, 2012). Tendo em conta todas estas vantagens, a espécie *Hediste diversicolor* tem sido usada em vários estudos de ecotoxicologia (Durou *et al.*, 2007, Lewis e Galloway, 2008, Solé *et al.*, 2009, Kalman *et al.*, 2010).

3.2.4 Coleta, quarentena e exposição da espécie *Hediste diversicolor* ao diclofenac

Os indivíduos da espécie *Hediste diversicolor* foram recolhidos à mão, com ajuda de um gadanho, com maré vazante, no estuário de Rio Douro, na Reserva Natural do Estuário do Douro (Baía de São Paio, 41° 08'22"N, 8° 39' 38"W), Vila Nova de Gaia. Os indivíduos foram capturados no período de janeiro a abril de 2017.

De seguida os indivíduos foram transportados até ao laboratório, em baldes. Já no laboratório, os mesmos foram colocados em caixas com sedimento (200 indivíduos/m²), água do mar com salinidade de 21 e arejamento contínuo. O sedimento usado proveio do estuário onde os indivíduos foram colhidos, tendo sido lavado com água destilada e seco, antes de ser usado.

Os indivíduos foram mantidos em quarentena durante uma semana. Durante este período os mesmos foram alimentados com ração para peixe ActivPet® a cada 48h.

O ensaio com os exemplares de *Hediste diversicolor* decorreu durante 28 dias. Foram usados 60 indivíduos no total, divididos em 4 grupos. Cada grupo, com 15 indivíduos, foi distribuído por 3 garrafões, com 5 indivíduos cada, perfazendo um total de 12 garrafões. A exposição dos animais foi feita em garrafões de 5L, previamente lavados com água destilada e secos. Em cada garrafão foi colocado 1L de sedimento, também previamente lavado com água destilada e seco, e 2L de água do mar, ajustando-se a salinidade para 21. O ensaio decorreu ao abrigo da luz pois o DFC é fotodegradável (Bartels e Tümpling, 2007). A cada 48h foi feita a renovação de 80% do meio, bem como a alimentação dos animais, com ração para peixes ActivPet®.

Os 4 grupos referidos anteriormente foram os seguintes: controlo (animais expostos sem adição de DFC); concentração baixa (exposição a 0,5 µg/L); concentração média (1 µg/L); concentração alta (2 µg/L). Estas concentrações, 0,5 µg/L, 1 µg/L e 2

$\mu\text{g/L}$, foram escolhidas com base em estudos prévios e simulando as concentrações que normalmente se encontram no compartimento aquático e que atingem um máximo de cerca de $2 \mu\text{g/L}$, em efluentes (Santos *et al.*, 2010, Schwaiger *et al.*, 2004, Guiloski *et al.*, 2015).

Durante o ensaio foram medidos os parâmetros físico-químicos da água com recurso a uma sonda multiparamétrica portátil (YSI, 556MPS). Os parâmetros medidos foram os seguintes: concentração de oxigénio ($9,9\pm 0,3 \text{ mg/L}$); pH ($8,4\pm 0,1$); temperatura ($15,2\pm 0,1^\circ\text{C}$).

Terminado o tempo de exposição, procedeu-se o sacrifício dos animais, para tal recorreu-se a um bisturi, sobre tampão fosfato gelado, para cortar o animal em duas porções, uma que contem a cabeça e a outra contendo o resto do corpo. Esta última foi a porção selecionada para o estudo e foi acondicionada em microtubos de Eppendorf, devidamente rotulados. Estes foram imediatamente colocados em azoto líquido (-196°C) e posteriormente armazenadas numa arca (-80°C).

3.3 Quantificação dos biomarcadores

3.3.1 Preparação das amostras

As amostras foram descongeladas lentamente, sobre gelo, e a preparação das mesmas passou pela sua homogeneização mecânica, a frio, com tampão fosfato 50 mM, a pH 7,0 com 0,1% de Triton X-100. Em seguida efetuou-se a centrifugação do homogeneizado a 15.000g , por 10 minutos, a 4°C de temperatura. Os sobrenadantes foram recuperados de modo a serem quantificados os biomarcadores pretendidos.

3.3.2 Quantificação da atividade da enzima catalase

A atividade da enzima CAT foi determinada a partir do método de Aebi (1984). Este método consiste na monitorização da decomposição do peróxido de hidrogénio (H_2O_2) no comprimento de onda de 240 nm, num espectrofotómetro leitor de microplacas (Labsystem Multiskan Ex).

A atividade da enzima foi obtida pela diferença da absorvância por unidade de tempo. As atividades foram expressas em mmol de H₂O₂ consumido por minuto por mg de proteína

3.3.3 Quantificação da atividade das isoenzimas GSTs

A determinação da atividade das isoenzimas GSTs foi feita a partir do método Habig et al. (1974). As GSTs catalizam a conjugação do substrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) com a glutationa reduzida (GSH), o que resulta na formação de um tioéter, que origina um aumento da absorvância. A leitura da absorvância é feita a $\lambda=340$ nm, num leitor de microplacas (Labsystem Multiskan Ex). Os resultados foram expressos em mmoles de tioéter produzido por minuto por mg de proteína.

3.3.4 Quantificação TBARS

O grau de LPO foi medido através da quantificação de TBARS, pelo método descrito por Buege and Aust (1978). Quando se dá a degradação inicial dos produtos das membranas lipídicas, pelo ataque das ERO, há formação de MDA. Estes últimos vão reagir com o TBA e as concentrações TBARS resultantes são expressas como equivalentes aos MDA. Este composto corado formado é suscetível de deteção do espetro visível, a $\lambda=535$ nm .

3.3.5 Quantificação da proteína total

A quantificação de proteína foi feita pelo método de Bradford (1976). Este baseia-se na ligação do corante Coomassie brilliant blue G-250, presente no reagente de Bradford, à proteína total presente na amostra, originando um composto corado estável, passível de ser lido espectralmente e quantificado a $\lambda=595$ nm.

Para esta quantificação foi ainda feita uma curva de calibração baseada nas absorvâncias correspondentes a concentrações conhecidas e crescentes de γ -globulina bovina. Tal permite-nos converter absorvâncias obtidas das amostras nos seus valores de concentração de proteína.

3.3.6 Análise Estatística

Os pressupostos necessários à realização dos testes paramétricos, nomeadamente a homogeneidade de variâncias e distribuição normal dos dados, foram previamente verificados. Realizou-se uma análise de variância unifatorial (One-Way ANOVA), seguida, se necessário ($p < 0,05$), do teste de Dunnett, para avaliar se existiam diferenças estatisticamente significativas para os diferentes biomarcadores entre as concentrações testadas em relação ao grupo controlo. Para a análise estatística foi usado o programa SigmaPlot® 11.2. Foi utilizado um nível de significância $\alpha = 0,05$. Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão.

4 Resultados

4.1 Catalase

Os resultados obtidos para a CAT (Fig.5) permitem observar um aumento da sua atividade nos grupos 1 $\mu\text{g/L}$ e 2 $\mu\text{g/L}$, embora não estatisticamente significativa (Análise de variância unifatorial: $F_{3,51} = 2,174$; $P = 0,103$).

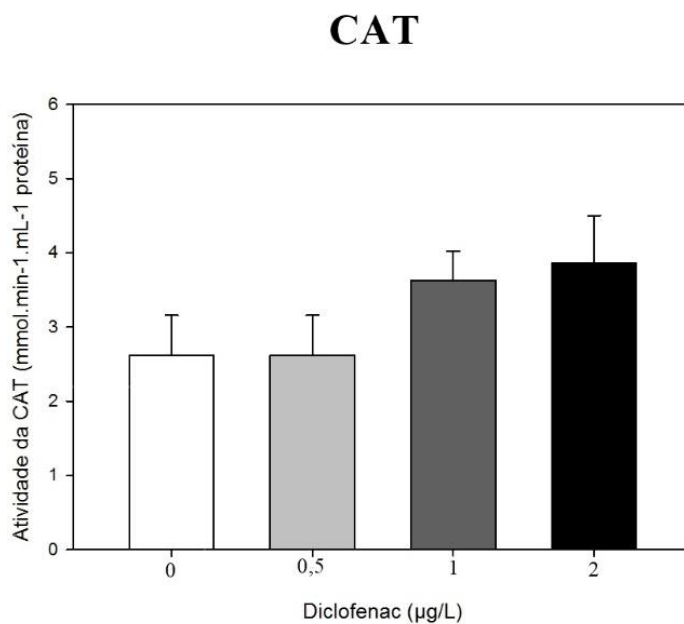


Fig. 5 - Atividade da enzima CAT determinada em indivíduos de *Hediste diversicolor* expostos de forma crónica (28 dias) a diferentes concentrações de DCF. Valores correspondentes a três réplicas \pm erro padrão.

4.2 GSTs

Os resultados obtidos para as GSTs (Fig. 6) mostram um aumento significativo da atividade enzimática deste biomarcador (Análise de variância unifatorial: $F_{3,50}=6,092$; $P=0,001$). Verificou-se uma indução significativa da atividade enzimática para as concentrações 1 µg/L e 2 µg/L de DCF, quando comparado com grupo controlo (Teste de Dunnett, $P<0,05$).

GSTs

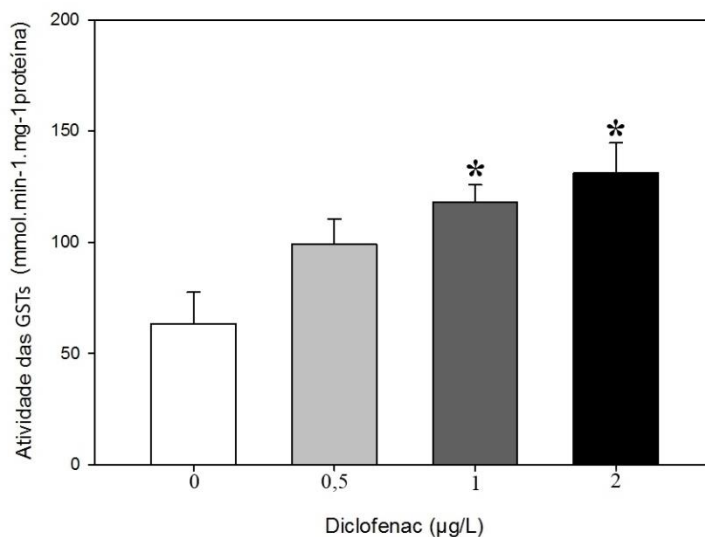


Fig. 6 - Atividade das enzimas GSTs em indivíduos de *Hediste diversicolor* expostos de forma crónica (28 dias) a diferentes concentrações de DCF. Valores correspondentes a três réplicas \pm erro padrão. * Diferenças significativamente válidas relativamente ao grupo controlo (0 µg/L) (Teste de Dunnett, $p < 0.05$)

4.3 TBARS

Os resultados para do ensaio TBARS (Fig. 7), indicam uma diminuição da peroxidação lipídica (Análise de variância unifatorial: $F_{3,53}=5,683$; $P=0,002$). Verificou-se uma diminuição significativa da mesma nos grupos 0,5 µg/L, 1 µg/L e 2 µg/L, face ao grupo controlo (Teste de Dunnett, $P < 0,05$).

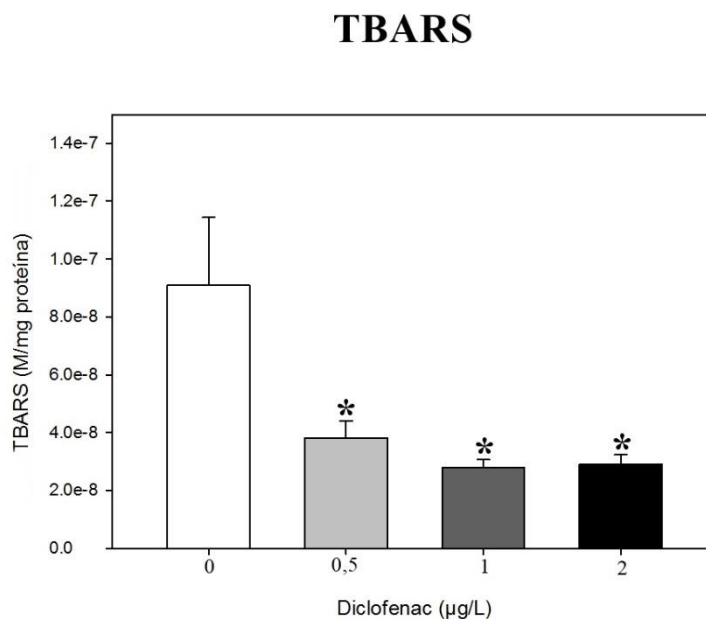


Fig. 7 - Ensaio TBARS em indivíduos de *Hediste diversicolor* expostos de forma crónica (28 dias) a diferentes concentrações de DCF. Valores correspondentes a três réplicas \pm erro padrão. * Diferenças significativamente válidas relativamente ao grupo controlo (0 $\mu\text{g/L}$) (Teste de Dunnett, $p < 0.05$)

5. Discussão

A importância deste estudo enquadra-se na problemática ambiental que resulta do elevado consumo mundial de DCF, estimado em 940 toneladas por ano, por via da sua prescrição na medicina humana e veterinária, sobretudo para alívio da dor e redução da inflamação, o que o torna um poluente emergente antropogénico (Zhang *et al.*, 2008, Lonappan *et al.*, 2016). O DCF tem sido alvo de vários estudos e está comprovado que é um contaminante comum de rios, estuários e lagos, sobretudo na Europa, e pode estar a comprometer de alguma forma a vida aquática (Lonappan *et al.*, 2016)

A ativação do metabolismo do DCF ocorre por duas vias principais, hidroxilação e glucoronização, através das monooxigenases do citocromo P450, tanto em humanos como em animais (Pourahmad *et al.*, 2011). Os metabolitos reativos resultantes originam uma diminuição do oxigénio citosólico, originando, assim, a formação de ERO

(Pourahmad *et al.*, 2011). Estas são neutralizados pela ação das enzimas antioxidantes, tais como as GSTs e a CAT (Oviedo-Gómez *et al.*, 2010, Islas-Flores *et al.*, 2013, Gómez-Oliván *et al.*, 2014). Exemplos destes estudos são os ensaios agudos com *Hyaella azteca*, exposta por 72 horas à concentração média letal (LC₅₀) de DCF, mostrando um aumento atividade CAT para todos os tempos de exposição avaliados (Oviedo-Gómez *et al.*, 2010), e em *Cyprinus carpio*, exposto por 96 horas à LC₅₀ de DCF, que causou um aumento da atividade da CAT às 12h e as 48h nas branquias, e às 72h no fígado (Islas-Flores *et al.*, 2013). Podemos também referir o ensaio crónico com *Rhamdia quelen*, o qual foi exposto por 28 dias a três concentrações distintas de DCF (0,2 µg/L, 2 µg/L e 20 µg/L) e revelou um aumento da atividade das GSTs no fígado para todas as concentrações (Guiloski *et al.*, 2017). A exposição da espécie em estudo a este fármaco, pode, então, desencadear situações de *stress* oxidativo, através da formação de espécies reativas, como ERO, ou compostos intermédios que têm capacidade de interagir com estruturas submoleculares, bem como com estruturas lipídicas e proteicas (Antunes *et al.*, 2010). Quando a concentração de DCF é muito elevada, a formação de ERO pode sobrepor-se à capacidade dessas enzimas protetoras as eliminarem e, assim sendo, o *stress* oxidativo causado pode originar ter efeitos nocivos sobre as macromoléculas celulares ao nível de lípidos, proteínas e DNA, podendo até causar morte celular (Giulio *et al.*, 1989, Aruoma, 1998, Halliwell e Gutteridge, 2015).

Este estudo mostrou que a exposição crónica da espécie *Hediste diversicolor* ao DCF nas concentrações usadas revelou uma tendência para o aumento da atividade da CAT, que, no entanto, não foi estatisticamente significativo. A CAT tem capacidade de neutralizar a ação tóxica do H₂O₂ sobre as células e equilibrar a sua produção no organismo (Blokhina *et al.*, 2003), oferecendo proteção contra a acumulação de H₂O₂ (Yoshioka *et al.*, 2006). Como a formação de H₂O₂ é mais exacerbada em situações de *stress* oxidativo, caso tal se verifique, irá consequentemente haver um aumento na atividade da CAT, evitando danos causados no decorrer dessa mesma situação (Hite *et al.*, 1999).

Seria esperado que ocorresse um aumento significativo na atividade desta enzima, decorrente da exposição ao fármaco, tendo em conta a previsível produção de ERO durante a sua metabolização (Pourahmad *et al.*, 2011). Tal leva a crer que a degradação

catalítica do H_2O_2 , o normal quando estamos perante *stress* oxidativo, não foi acompanhada pelo aumento da atividade enzimática, ou que não ocorreu um aumento suficiente da produção de H_2O_2 como consequência da exposição ao DCF. Outros estudos revelam um comportamento desta enzima semelhante ao que foi obtido no presente estudo, na exposição ao mesmo composto farmacológico: um estudo em peixes da espécie *Rhamdia quelen* apoia os resultados aqui obtidos: a exposição crónica (21 dias) a diferentes concentrações de DCF (0,2, 2 e 20 $\mu\text{g/L}$) não causou alterações significativas na atividade da CAT para todos os grupos em relação ao controlo, exceto para a concentração mais baixa (0,2 $\mu\text{g/L}$) em que houve até uma diminuição da mesma (Guiloski *et al.*, 2017). Outro estudo, em *Daphnia magna* revelou que a exposição da mesma a 9,7 mg/L de DCF por 48h (ensaio agudo) causou um aumento não significativo da atividade da CAT (Gómez-Oliván *et al.*, 2014).

As GSTs são um grupo de enzimas com capacidade desintoxicante sobre compostos tóxicos (Wilce e Parker, 1994). Um aumento da atividade das GSTs pode indicar a ativação de uma via metabólica do mecanismo de biotransformação de reações de fase II, bem como do sistema de defesa antioxidante (Trute *et al.*, 2007, Gröner *et al.*, 2015) havendo conjugação da GSH com o composto farmacológico em estudo, mediado pelas isoenzimas GSTs (Gonzalez-Rey e Bebianno, 2014).

Este estudo mostrou que a exposição crónica da espécie em estudo ao DCF causou um aumento da atividade das GSTs, proporcional ao aumento da concentração de DCF, havendo um aumento significativo para os dois grupos expostos às concentrações mais elevadas (1 e 2 $\mu\text{g/L}$), em relação ao grupo controlo. Estes resultados sugerem uma tentativa por parte do organismo-teste em eliminar o composto tóxico, bem como as ERO produzidas, como mecanismo de defesa ao *stress* oxidativo (Ezemonye e Ikpesu, 2011). Existem outros estudos relativamente a alterações nas GSTs pela exposição ao DCF em concordância com os resultados aqui obtidos, como o estudo realizado por Quinn *et al.* (2011) em *Dreissena polymorpha* que mostrou que a exposição, por 96 h (ensaio agudo) a 1 e 1000 $\mu\text{g/L}$ de DCF aumentou significativamente a expressão das GSTs quando comparado ao grupo controlo (Quinn *et al.*, 2011). Outro estudo realizado por Guiloski *et al.* (2017) em *Rhamdia quelen* que foram sujeitos um ensaio crónico (21 dias) com

concentrações de 0,2, 2 e 20 µg/L de DCF revelou aumento da atividade das GSTs no fígado para todas as concentrações em relação ao controlo (Guiloski *et al.*, 2017).

Mesmo com os mecanismos de defesa antioxidante fisiológicos a combaterem as ERO, muitas vezes ocorre dano oxidativo, ou porque a produção de ERO é muito extensa, ou porque a capacidade protetora do organismo não é eficiente. Quando tal acontece, pode haver um ataque às estruturas lipídicas biológicas, envolvendo a produção de compostos, como o MDA. Neste estudo pôde verificar-se um aumento da atividade das enzimas antioxidantes CAT (embora estatisticamente não significativo) e GSTs, bem como uma diminuição dos níveis de TBARS, e, portanto, da LPO. O aumento da atividade das enzimas antioxidantes exerce um efeito protetor contra as ERO originadas durante a metabolização do DCF, impedindo ou diminuindo até danos consequentes de *stress* oxidativo, explicando a diminuição da concentração de TBARS (Gravato *et al.*, 2010). Esta diminuição da LPO é indicativa da efetividade do mecanismo de defesa contra ERO por parte das enzimas antioxidantes, que têm, portanto, uma ação pró-oxidante, e protegem contra danos tecidulares resultantes do *stress* oxidativo (Gonzalez-Rey e Bebianno, 2014), a ação das enzimas antioxidantes poderá ter atingido ERO produzidas pelo próprio organismo, e dessa forma levar ao declínio da LPO. Outros estudos de exposição ao DCF obtiveram resultados semelhantes. Um estudo por Stepanova *et al.* (2013) com a espécie *Cyprinus carpio* exposta a diferentes concentrações de DCF (0,015, 0,03, 1, e 3 mg/L) indica um decréscimo significativo na atividade de TBARS, ou seja, uma redução da LPO, em todas as concentrações de DCF, exceto a mais baixa, em relação ao controlo (Stepanova *et al.*, 2013). Os resultados de outro estudo, por Feito *et al.* (2012), um ensaio de curta duração (90 minutos) em *Danio rerio* mostram uma diminuição da atividade TBARS para a exposição a 0,03 µg/L de DCF (Feito *et al.*, 2012).

6. Conclusões

Neste trabalho, a exposição crónica da espécie *Hediste diversicolor* a diferentes concentrações de DCF permitiu confirmar a sua capacidade pró-oxidativa, nomeadamente para o biomarcador de *stress* oxidativo GSTs para o qual houve um aumento da atividade conforme o aumento da concentração de DCF. Esta atividade pró-

Análise dos efeitos do diclofenac em concentrações ambientalmente realistas em *Hediste diversicolor* através de biomarcadores de stress oxidativo e peroxidação lipídica

oxidativa reflete-se também nos resultados referentes ao ensaio TBARS, no qual se verificou uma diminuição da LPO.

A resposta da *Hediste diversicolor* ao composto neste estudo permite, mais uma vez, concluir acerca da sua toxicidade, sendo, no entanto, necessários mais estudos e uso de outros biomarcadores que assinalem o seu papel ecotoxicológico. De elevado interesse seria analisar efeitos em organismos aquáticos de níveis tróficos superiores, de forma a analisar possíveis fenómenos de bioacumulação.

7. Referências bibliográficas

- Aberson, M. J. R.; Bolamb, S. G. e Hughes, R. G. (2016). The effect of sewage pollution on the feeding behaviour and diet of Hediste (*Nereis diversicolor* (O.F.Müller, 1776)) in three estuaries in south-east England, with implications for saltmarsh erosion. *Marine Pollution Bulletin*, pp. 1-11.
- Acuña, V.; Ginebreda, A.; Mor, J. R.; Petrovic, M.; Sabater, S.; Sumpter, J. e Barceló, D. (2015). Balancing the health benefits and environmental risks of pharmaceuticals: Diclofenac as an example. *Environment International*, 85, pp. 327–333.
- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105, pp. 121-126.
- Altman, R.; Bosch, B.; Brune, K.; Patrignani, P. e Young, C. (2015). Advances in NSAID Development: Evolution of Diclofenac Products Using Pharmaceutical Technology. *Drugs*, 75, pp. 859–877.
- Amorim, L. C. A. (2003). Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, 6, pp. 158-170.
- Antunes, S. C.; Marques, S. M.; Pereira, R.; Gonçalves, F. e Nunes, B. (2010). Testing procedures for the determination of several biomarkers in different species, for environmental assessment of pollution. *Journal of Environmental Monitoring*, 12, pp. 1625–1630.
- Arnold, K. E.; Brown, A. R.; Ankley, G. T. e Sumpter, J. P. (2014). Medicating the environment: assessing risks of pharmaceuticals to wildlife and ecosystems. *Philosophical transactions of the Royal Society B*, 369, pp. 1-11.
- Aruoma, O. I. (1998). Free Radicals, Oxidative Stress, and Antioxidants in Human Health and Disease. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75.
- Bartels, P. e Tümpling, W. (2007). Solar radiation influence on the decomposition process of diclofenac in surface waters. *Science of the Total Environment*, 374, pp. 143–155.

Beausse, J. (2004). Selected drugs in solid matrices: a review of environmental determination, occurrence and properties of principal substances. *Trends in Analytical Chemistry*, 23, pp. 10-11.

Birben, E.; Sahiner, U. M.; Sackesen, C.; Erzurum, S. e Kalayci, O. (2012). Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organization Journal*, 5, pp. 9-19.

Blokhina, O.; Virolainen, E. e Fagerstedt, K. V. (2003). Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of Botany*, 91, pp. 179–194.

Bouraoui, Z.; Banni, M.; Ghedira, J.; Clerandeanu, C.; Narbonne, J. F. e Boussetta, H. (2009). Evaluation of enzymatic biomarkers and lipoperoxidation level in *Hediste diversicolor* exposed to copper and benzo[a]pyrene. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72, pp. 1893–1898.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, pp. 248-254.

Brausch, J. M.; Connors, K. A.; Brooks, B. W. e Rand, G. M. (2012). Human Pharmaceuticals in the Aquatic Environment: A Review of Recent Toxicological Studies and Considerations for Toxicity Testing. *Human Pharmaceuticals in the Aquatic Environment: A Review of Recent Toxicological Studies and Considerations for Toxicity Testing*, 218, pp. 1-99.

Brogden, R. N.; Heel, R. C.; Pakes, G. E.; Speight, T. M. e Avery, G. S. (1980). Diclofenac Sodium: A Review of its Pharmacological Properties and Therapeutic Use in Rheumatic Diseases and Pain of Varying Origin. *Drugs* 20, pp. 24-48.

Buege, J. A. e Aust, S. D. (1978). Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, 52, pp. 302-310.

Buffet, P.; Tankoua, O. F.; Pan, J.-F.; Berhanu, D.; Herrenknecht, C.; Poirier, L.; Amiard-Triquet, C.; Amiard, J.; Bérard, J.; Risso, C.; Guibbolini, M.; Roméo, M.; Reip, P.; Valsami-Jones, E. e Mouneyrac, C. (2011). Behavioural and biochemical responses of

two marine invertebrates *Scrobicularia plana* and *Hediste diversicolor* to copper oxide nanoparticles. *Chemosphere*, 84, pp. 166–174.

Burkina, V.; Zlabek, V. e Zamaratskaia, G. (2013). Clotrimazole, but not dexamethasone, is a potent in vitro inhibitor of cytochrome P450 isoforms CYP1A and CYP3A in rainbow trout. *Chemosphere*, 92, pp. 1099-1104.

Buser, H.; Poiger, T. e Müller, M. D. (1998). Occurrence and Fate of the Pharmaceutical Drug Diclofenac in Surface Waters: Rapid Photodegradation in a Lake. *Environmental Science & Technology*, 32, pp. 3449–3456.

Catalá, A. (2006). An overview of lipid peroxidation with emphasis in outer segments of photoreceptors and the chemiluminescence assay. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 38, pp. 1482–1495.

Catalano, B.; Moltedo, G.; Martuccio, G.; Gastaldi, L.; Virno-Lamberti, C.; Lauria, A. e Ausili, A. (2012). Can *Hediste diversicolor* (Nereidae, Polychaete) be considered a good candidate in evaluating PAH contamination? A multimarker approach. *Chemosphere*, 86, pp. 875–882.

Cleuvers, M. (2003). Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. *Toxicology Letters*, 142, pp. 185-194.

Cleuvers, M. (2004). Mixture toxicity of the anti-inflammatory drugs diclofenac, ibuprofen, naproxen, and acetylsalicylic acid. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 59, pp. 309–315.

Corcoran, J.; Winter, M. J. e Tyler, C. R. (2010). Pharmaceuticals in the aquatic environment: A critical review of the evidence for health effects in fish. *Critical Reviews in Toxicology*, 40, pp. 287–304.

Costa, C. R.; Olivi, P.; Botta, C. M. R. e Espindola, E. L. G. (2008). A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. *Química Nova*, 31, pp. 1820-1830.

Daughton, C. G. e Ternes, T. A. (1999). Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment: Agents of Subtle Change? *Environmental Health Perspectives*, 107, pp. 907-938.

Davies, N. M. e Anderson, K. E. (1997). Clinical Pharmacokinetics of Diclofenac: Therapeutic Insights and Pitfalls. *Clinical Pharmacokinetics*, 33, pp. 184-213.

Dean, H. K. (2008). The use of polychaetes (Annelida) as indicator species of marine pollution: a review. *Revista de Biología Tropical*, 56, pp. 11-38.

Durou, C.; Poirier, L.; Amiard, J.; Budzinski, H.; Gnassia-Barelli, M.; Lemenach, K.; Peluhet, L.; Mouneyrac, C.; Roméo, M. e Amiard-Triquet, C. (2007). Biomonitoring in a clean and a multi-contaminated estuary based on biomarkers and chemical analyses in the endobenthic worm *Nereis diversicolor*. *Environmental Pollution*, 148, pp. 445-458.

Ezemonye, L. I. N. e Ikpesu, T. O. (2011). Evaluation of sub-lethal effects of endosulfan on cortisol secretion, glutathione S-transferase and acetylcholinesterase activities in *Clarias gariepinus*. *Food and Chemical Toxicology*, 49, pp. 1898-1903.

Fabbri, E. e Franzellitti, S. (2016). Human Pharmaceuticals in the Marine Environment: Focus on Exposure and Biological Effects in Animal Species *Environmental Toxicology and Chemistry*, 35, pp. 799–812.

Feito, R.; Valcárcel, Y. e Catalá, M. (2012). Biomarker assessment of toxicity with miniaturised bioassays: diclofenac as a case study. *Ecotoxicology*, 21, pp. 289–296.

Fent, K.; A. Weston, A. e Caminada, D. (2006). Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology*, 76, pp. 122–159.

Ferrari, B.; Paxéus, N.; Giudice, R. L.; Pollio, A. e Garrica, J. (2003). Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters: study of carbamazepine, clofibrac acid, and diclofenac. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 55.

Fish, J. D. e Fish, S. (1989). *A student's guide to the seashore*. Cambridge, Cambridge University Press pp.158-160.

Gaikwad, S. S. (2017). A Review: Analytical Methods For Determination Of Diclofenac In Pharmaceutical Samples. *International Journal of Innovative Research and Advanced Studies (IJIRAS)*, 4, pp. 12-15.

Gan, T. J. (2010). Diclofenac: an update on its mechanism of action and safety profile. *Current Medical Research & Opinion*, 26, pp. 1715–1731.

Gillet, P.; Mouloud, M.; Durou, C. e Deutsch, B. (2008). Response of *Nereis diversicolor* population (Polychaeta, Nereididae) to the pollution impact. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 76, pp. 201-210.

Giulio, R. T. D.; Washburn, P. C. e Wennin, R. J. (1989). Biochemical Responses in Aquatic Animals: A Review of Determinants of Oxidative Stress *Environmental Toxicology and Chemistry*, 8, pp. 1103-1123.

Goksøyr, A. e Förlin, L. (1992). The cytochrome P-450 system in fish, aquatic toxicology and environmental monitoring. *Aquatic Toxicology*, 22, pp. 287-311.

Gómez-Oliván, L. M.; Galar-Martínez, M.; García-Medina, S.; Valdés-Alanís, A.; Islas-Flores, H. e Neri-Cruz, N. (2014). Genotoxic response and oxidative stress induced by diclofenac, ibuprofen and naproxen in *Daphnia magna*. *Drug and Chemical Toxicology*, 37, pp. 391–399.

Gómez, M. J.; Bueno, M. J. M.; Lacorte, S.; Fernández-Alba, A. R. e Agüera, A. (2007). Pilot survey monitoring pharmaceuticals and related compounds in a sewage treatment plant located on the Mediterranean coast. *Chemosphere*, 66, pp. 993–1002.

Gonzalez-Rey, M. e Bebianno, M. J. (2014). Effects of non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) diclofenac exposure in mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic Toxicology*, 148, pp. 221–230.

Gravato, C.; Guimarães, L.; Santos, J.; Faria, M.; Alves, A. e Guilhermino, L. (2010). Comparative study about the effects of pollution on glass and yellow eels (*Anguilla anguilla*) from the estuaries of Minho, Lima and Douro Rivers (NW Portugal). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73, pp. 524–533.

Gröner, F.; Ziková, A. e Kloas, W. (2015). Effects of the pharmaceuticals diclofenac and metoprolol on gene expression levels of enzymes of biotransformation, excretion pathways and estrogenicity in primary hepatocytes of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 167, pp. 51-57.

Gros, M.; Petrović, M.; Ginebreda, A. e Barceló, D. (2010). Removal of pharmaceuticals during wastewater treatment and environmental risk assessment using hazard indexes. *Environment International*, 36, pp. 15–26.

Grotto, D.; Maria, L. S.; Valentini, J.; Paniz, C.; Schmitt, G. e Garcia, S. C. (2009). Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects for malondialdehyde quantification. *Química Nova*, 32, pp. 169-174.

Guiloski, I. C.; Piancini, L. D. S.; Dagostim, A. C.; Calado, S. L. D. M.; Fávares, L. F.; Boschen, S. L.; Cestari, M. M.; Cunha, C. D. e Assis, H. C. S. D. (2017). Effects of environmentally relevant concentrations of the anti-inflammatory drug diclofenac in freshwater fish *Rhamdia quelen*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 139, pp. 291–300.

Guiloski, I. C.; Ribas, J. L. C.; Pereira, L. D. S.; Neves, A. P. P. e Assis, H. C. S. D. (2015). Effects of trophic exposure to dexamethasone and diclofenac in freshwater fish. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 114, pp. 204-211.

Gutteridge, J. M. C. M. (1995). Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *The American Association for Clinical Chemistry*, 41, pp. 1819-1828.

Habig, W. H.; Pabst, M. J. e Jakoby, W. B. (1974). Glutathione S-Transferases: The First Enzymatic Step In Mercapturic. *The Journal of Biological Chemistry*, 249, pp. 7130-7139.

Halling-Sørensen, B.; Nielsen, S. N.; Lanzky, P. F.; Ingerslev, F.; Lützhøft, H. C. H. e Jørgensen, S. E. (1998). Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment- A review. *Chemosphere*, 36, pp. 357-393.

Halliwell, B. e Chirico, S. (1993). Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *he American Journal of Clinical Nutrition*, 57.

Halliwell, B. e Gutteridge, J. M. C. (2015). *Free Radicals in Biology and Medicine*, United States of America, Oxford University Press.

Heberer, T. e Feldmann, D. (2005). Contribution of effluents from hospitals and private households to the total loads of diclofenac and carbamazepine in municipal sewage effluents—modeling versus measurements. *Journal of Hazardous Materials*, 122, pp. 211–218.

Hester, R. E. e Harrison, R. M. (2015). *Pharmaceuticals in the Environment*, The Royal Society of Chemistry.

Hite, D. R. C.; Auh, C. e Scandalios, J. G. (1999). Catalase activity and hydrogen peroxide levels are inversely correlated in maize scutella during seed germination. *Redox Report*, 4, pp. 29-34.

Hong, H. N.; Kim, H. N.; Park, K. S.; Lee, S. e Gu, M. B. (2007). Analysis of the effects diclofenac has on Japanese medaka (*Oryzias latipes*) using real-time PCR. *Chemosphere* 67, pp. 2115–2121.

Huggett, R. J.; Klmerle, R. A.; Paul M. Mehrle, J. e Bergman, H. L. (1992). *Biomarkers: Biochemical, Physiological, and Histological Markers of Anthropogenic Stress*, CRC Press.

Hyne, R. V. e Maher, W. A. (2003). Invertebrate biomarkers: links to toxicosis that predict population decline. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 54, pp. 366–374.

Islas-Flores, H.; Gómez-Oliván, L. M.; Galar-Martínez, M.; Colín-Cruz, A.; Neri-Cruz, N. e García-Medina, S. (2013). Diclofenac-induced oxidative stress in brain, liver, gill and blood~ of common carp (*Cyprinus carpio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 92, pp. 32–38.

Jesus, T. B. D. e Carvalho, C. E. V. D. (2008). Utilização de biomarcadores em peixes como ferramenta para avaliação de contaminação ambiental por mercúrio (Hg). *Oecologia Australis*, 12, pp. 680-693.

Joss, A.; Keller, E.; Alder, A. C.; Gobel, A.; Mcardell, C. S.; Ternes, T. e Siegrist, H. (2005). Removal of pharmaceuticals and fragrances in biological wastewater treatment. *Water Research*, 39, pp. 3139–3152.

Kalman, J.; Buffet, P. E.; Amiard, J. C.; Denis, F.; Mouneyrac, C. e Amiard-Triquet, C. (2010). Assessment of the influence of confounding factors (weight, salinity) on the response of biomarkers in the estuarine polychaete *Nereis diversicolor*. *Biomarkers*, 15, pp. 461–469.

Kalman, J.; Palais, F.; Amiard, J. C.; Mouneyrac, C.; Muntz, A.; Blasco, J.; Riba, I. e Amiard-Triquet, C. (2009). Assessment of the health status of populations of the ragworm *Nereis diversicolor* using biomarkers at different levels of biological organisation. *Marine Ecology Progress Series*, 393, pp. 55–67.

Khessiba, A.; Roméo, M. e Aïssa, P. (2005). Effects of some environmental parameters on catalase activity measured in the mussel (*Mytilus galloprovincialis*) exposed to lindane. *Environmental Pollution*, 133, pp. 275–281.

Kim, S. D.; Cho, J.; Kim, I. S.; Vanderford, B. J. e Snyder, S. A. (2007). Occurrence and removal of pharmaceuticals and endocrine disruptors in South Korean surface, drinking, and waste waters. *Water Research*, 41, pp. 1013 – 1021.

Kosjek, T.; Heath, E.; Petrović, M. e Barceló, D. (2007). Mass spectrometry for identifying pharmaceutical biotransformation products in the environment. *Trends in Analytical Chemistry*, 26, pp. 1076-1085.

Kummerer, K. (2009). The presence of pharmaceuticals in the environment due to human use – present knowledge and future challenges. *Journal of Environmental Management*, 90, pp. 2354–2366.

- Lee, J.; Ji, K.; Kho, Y. L.; Kim, P. e Choi, K. (2011). Chronic exposure to diclofenac on two freshwater cladocerans and Japanese medaka. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74, pp. 1216–1225.
- Letzel, M.; Metzner, G. e Letzel, T. (2009). Exposure assessment of the pharmaceutical diclofenac based on long-term measurements of the aquatic input. *Environment International*, 35, pp. 363–368.
- Lewis, C. e Galloway, T. (2008). Genotoxic damage in polychaetes: A study of species and cell-type sensitivities. *Mutation Research*, 654.
- Li, W. C. (2014). Occurrence, sources, and fate of pharmaceuticals in aquatic environment and soil. *Environmental Pollution*, 187, pp. 193-201.
- Lima, É. S. e Abdalla, D. S. P. (2001). Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 37, pp. 293-303.
- Löffler, D.; Römbke, J.; Meller, M. e Ternes, T. A. (2005). Environmental Fate of Pharmaceuticals in Water/Sediment Systems. *Environmental Science & Technology*, 39, pp. 5209-5218.
- Lonappan, L.; Brar, S. K.; Das, R. K.; Verma, M. e Surampalli, R. Y. (2016). Diclofenac and its transformation products: Environmental occurrence and toxicity - A review. *Environment International*, 96, pp. 127–138.
- López-Torres, M.; Pérez-Campo, R.; Cadenas, S.; Rojas, C. e Barja, G. (1993). A comparative study of free radicals in vertebrates - II. Non-enzymatic antioxidants and oxidative stress *Comparative Biochemistry and Physiology*, 105 B, pp. 757-763.
- Magalhães, D. P. e Filho, A. S. F. (2008). A Ecotoxicologia Como Ferramenta No Biomonitoramento De Ecossistemas Aquáticos. *Oecologia brasiliensis*, 12, pp. 355-381.
- Maranho, L. A.; André, C.; Delvalls, T. A.; Gagnéc, F. e Martín-Díaz, M. L. (2015). Toxicological evaluation of sediment samples spiked with human pharmaceutical products: Energy status and neuroendocrine effects in marine polychaetes *Hediste diversicolor*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 118, pp. 27–36.

Maranho, L. A.; Baena-Nogueras, R. M.; Lara-Martín, P. A.; Delvalls, T. A. e Martín-Díaz, M. L. (2014). Bioavailability, oxidative stress, neurotoxicity and genotoxicity of pharmaceuticals bound to marine sediments. The use of the polychaete *Hediste diversicolor* as bioindicator species. *Environmental Research*, 134, pp. 353–365.

Meredith-Williams, M.; Carter, L. J.; Fussell, R.; Raffaelli, D.; Ashauer, R. e Boxall, A. B. A. (2012). Uptake and depuration of pharmaceuticals in aquatic invertebrates. *Environmental Pollution*, 165, pp. 250-258.

Metcalfe, C. D.; Miao, X. S.; Koenig, B. G. e Struger, J. (2009). Distribution of acidic and neutral drugs in surface waters near sewage treatment plants in the lower Great Lakes, Canada. *Environmental Chemistry*, 22, pp. 2881-2889.

Moreira, S. M.; Lima, I.; Ribeiro, R. e Guilhermino, L. (2006). Effects of estuarine sediment contamination on feeding and on key physiological functions of the polychaete *Hediste diversicolor*: Laboratory and in situ assays. *Aquatic Toxicology*, 78, pp. 186–201.

Nunes, B. (2011). A presença de fármacos no ambiente. *Acta Farmacêutica Portuguesa*, 1, pp. 44-54.

Oaks, J. L.; Gilbert, M.; Virani, M. Z.; Watson, R. T.; Meteyer, C. U.; Rideout, B. A.; Shivaprasad, H. L.; Ahmed, S.; Chaudhry, M. J. I.; Arshad, M.; Mahmood, S.; Ali, A. e Khan, A. A. (2004). Diclofenac residues as the cause of vulture population decline in Pakistan. *Nature*, 427, pp. 630-633.

Obolewski, K.; Strzelczak, A. e Bodo, K. (2009). Quantitative structure of *Hediste diversicolor* (O.F. Müller) in estuary zones of the southern Baltic Sea. *Baltic Coastal Zone*, 13, pp. 147-161.

Ollers, S.; Singer, H. P.; Fassler, P. e Muller, S. R. (2001). Simultaneous quantification of neutral and acidic pharmaceuticals and pesticides at the low-ng/ l level in surface and waste water. *Journal of Chromatography*, 911, pp. 225–234.

- Oost, R. V. D.; Beyer, J. e Vermeulen, N. P. E. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13, pp. 57-149.
- Ort, C.; Hollender, J.; Schaerer, M. e Siegrist, H. (2009). Model-Based Evaluation of Reduction Strategies for Micropollutants from Wastewater Treatment Plants in Complex River Networks. *Environmental Science & Technology*, 43, pp. 3214-3220.
- Ott, M.; Gogvadze, V.; Orrenius, S. e Zhivotovsky, B. (2007). Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis*, 12, pp. 913-922.
- Oviedo-Gómez, D. G. C.; Galar-Martínez, M.; García-Medina, S.; Razo-Estrada, C. e Gómez-Oliván, L. M. (2010). Diclofenac-enriched artificial sediment induces oxidative stress in *Hyalella azteca*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 29, pp. 39-43.
- Parolini, M.; Quinn, B.; Binelli, A. e Provini, A. (2011). Cytotoxicity assessment of four pharmaceutical compounds on the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) haemocytes, gill and digestive gland primary cell cultures. *Chemosphere*, 84, pp. 91-100.
- Peakall, D. (1992). *Animal Biomarkers as Pollution Indicators*, Chapman & Hall.
- Peck, T.; Hill, S. e Williams, M. (2008). *Pharmacology for Anaesthesia and Intensive Care*, Cambridge University Press.
- Pereira, A. M. P. T.; Silva, L. J. G.; Lino, C. M.; Meisel, L. M. e Pena, A. (2016). Assessing environmental risk of pharmaceuticals in Portugal: An approach for the selection of the Portuguese monitoring stations in line with Directive 2013/39/EU. *Chemosphere*, 144, pp. 2507 - 2515.
- Pourahmad, J.; Mortada, Y.; Eskandari, M. R. e Shahraki, J. (2011). Involvement of Lysosomal Labilisation and Lysosomal/mitochondrial Cross-Talk in Diclofenac Induced Hepatotoxicity. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 10.
- Quinn, B.; Schmidt, W.; O'rourke, K. e Hernan, R. (2011). Effects of the pharmaceuticals gemfibrozil and diclofenac on biomarker expression in the zebra mussel (*Dreissena*

polymorpha) and their comparison with standardised toxicity tests. *Chemosphere*, 84, pp. 657–663.

Ramsey, I. (2011). *Small Animal Formulary*, British Small Animal Veterinary Association.

Ray, P. D.; Huang, B. e Tsuji, Y. (2012). Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular Signalling*, 24, pp. 981-990.

Sachdeva, M.; Karan, M.; Singh, T. e Dhingra, S. (2014). Oxidants and Antioxidants in Complementary and Alternative Medicine: A Review. *Spatula DD*, 4, pp. 1-16.

Santos, L. H. M. L. M.; Araújo, A. N.; Fachini, A.; Pena, A.; Delerue-Matos, C. e Montenegro, M. C. B. S. M. (2010). Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *Journal of Hazardous Materials*, 175, pp. 45–95.

Saraf, S. (2008). *Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs - An Overview*, PharmaMed Press.

Scaps, P. (2002). A review of the biology, ecology and potential use of the common ragworm *Hediste diversicolor*. *Hydrobiologia*, 470, pp. 203–218.

Schieber, M. e Chandel, N. S. (2014). ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. *Current Biology*, 24, pp. 453-462.

Schmitt-Jansen, M.; Bartels, P.; Adler, N. e Altenburger, R. (2007). Phytotoxicity assessment of diclofenac and its phototransformation products. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387, pp. 1389–1396.

Schwaiger, J.; Ferling, H.; Mallow, U.; H.Wintermayr e Negele, R. D. (2004). Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac Part I: histopathological alterations and bioaccumulation in rainbow trout. *Aquatic Toxicology*, 68, pp. 141–150.

Schwarz, S.; Schmiege, H.; Scheurer, M.; Köhler, H.-R. e Triebkorn, R. (2017). Impact of the NSAID diclofenac on survival, development, behaviour and health of embryonic

and juvenile stages of brown trout, *Salmo trutta f. fario*. *Science of the Total Environment*, 607–608, pp. 1026–1036.

Simon, L. S. (2001). COX-2 Inhibitors. *Gastroenterology Clinics of North America*, 30, pp. 1011-1025.

Skoutakis, V. A.; Carter, C. A.; Mickle, T. R.; Smith, V. H.; Arkin, C. R.; Alissandratos, J. e Petty, D. E. (1988). Review of Diclofenac and Evaluation of its Place in Therapy as a Nonsteroidal Antiinflammatory Agent. *Annals of Pharmacotherapy*, 22.

Snyder, M. J. (2000). Cytochrome P450 enzymes in aquatic invertebrates: recent advances and future directions. *Aquatic Toxicology*, 48, pp. 529–547.

Solé, M.; Kopecka-Pilarczyk, J. e Blasco, J. (2009). Pollution biomarkers in two estuarine invertebrates, *Nereis diversicolor* and *Scrobicularia plana*, from a Marsh ecosystem in SW Spain. *Environment International*, 35, pp. 523–531.

Soulet, B.; Tauxe, A. e Tarradellas, J. (2002). Analysis of Acidic Drugs in Swiss Wastewaters. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 82, pp. 659–667.

Stepanova, S.; Praskova, E.; Chromcova, L.; Plhalova, L.; Prokes, M.; Blahova, J. e Svobodova, Z. (2013). The effects of diclofenac on early life stages of common carp (*Cyprinus carpio*). *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 35, pp. 454–460.

Strenn, B.; Clara, M.; Gans, O. e Kreuzinger, N. (2004). Carbamazepine, diclofenac, ibuprofen and bezafibrate – investigations on the behaviour of selected pharmaceuticals during wastewater treatment. *Water Science & Technology*, 50, pp. 269-276.

Stülten, D.; Zühlke, S.; Lamshöft, M. e Spiteller, M. (2008). Occurrence of diclofenac and selected metabolites in sewage effluents. *Science of the Total Environment*, 405, pp. 310 – 316.

Stumpf, M.; Ternes, T. A.; Wilken, R.; Rodrigues, S. V. e Baumann, W. (1999). Polar drug residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *The Science of the Total Environment*, 225, pp. 135-141.

- Tarr, G. e Reuter, H. (2015). Review of the safety of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and selective cyclo-oxygenase-2 inhibitors. *South African Family Practice*, 57, pp. 18-22.
- Tauxe-Wuersch, A.; Alencastro, L. F. D.; Grandjean, D. e Tarradellas, J. (2005). Occurrence of several acidic drugs in sewage treatment plants in Switzerland and risk assessment. *Water Research*, 39, pp. 1761–1772.
- Ternes, T. A. (1998). Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water Research*, 32, pp. 3245-3260.
- Tew, K. D. e Ronai, Z. E. (1999). GST function in drug and stress response. *Drug Resistance Updates*, 2, pp. 143–147.
- Timbrell, J. A. (1998). Biomarkers in toxicology. *Toxicology*, 129, pp. 1-12.
- Todd, P. A. e Sorkin, E. M. (1988). Diclofenac Sodium: A Reappraisal of its Pharmacodynamic and Phannacokinetic Properties, and Therapeutic Efficacy. *Drugs* 35, pp. 244-285.
- Triebkorn, R.; Casper, H.; A.Heyd; Eikemper, R.; Köhler, H.-R. e Schwaiger, J. (2004). Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac Part II. Cytological effects in liver, kidney, gills and intestine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology*, 68, pp. 151–166.
- Trute, M.; Gallis, B.; Doneanu, C.; Shaffer, S.; Goodlett, D. e Gallagher, E. (2007). Characterization of hepatic glutathione S-transferases in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Aquatic Toxicology*, 81, pp. 126-136.
- Turrens, J. F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of Physiology* 552, pp. 335-344.
- Uchida, K. (1999). Current Status of Acrolein as a Lipid Peroxidation Product. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 9.

- Verma, A. e Stellacci, F. (2010). Effect of Surface Properties on Nanoparticle–Cell Interactions. *Small*, 6, pp. 12–21.
- Vieno, N. e Sillanpää, M. (2014). Fate of diclofenac in municipal wastewater treatment plant — A review. *Environment International*, 69, pp. 28–39.
- Wheeler, C. R.; Salzman, J. A.; Elsayed, N. M.; Omaye, S. T. e Don W. Korte, J. (1990). Automated Assays for Superoxide Dismutase, Catalase, Glutathione Peroxidase, and Glutathione Reductase Activity. *Analytical Biochemistry* 184, pp. 193-199.
- Wiegand, C.; Pflugmacher, S.; Oberemm, A. e Steinberg, C. (2000). Activity Development of Selected Detoxication Enzymes during the Ontogenesis of the Zebrafish (*Danio rerio*). *International Review of Hydrobiology*, 85, pp. 413-422.
- Wilce, M. C. J. e Parker, M. W. (1994). Structure and function of glutathione S-transferases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1205, pp. 1-18.
- Winston, G. W. e Giulio, R. T. D. (1991). Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms *Aquatic Toxicology*, 19, pp. 137-161.
- Winston, G. W.; Livingstone, D. R. e Lip, F. (1990). Oxygen Reduction Metabolism by the Digestive Gland of the Common Marine Mussel, *Mytilus edulis* L. *The Journal Of Experimental Zoology*, 255, pp. 296-308.
- World Health Organization (WHO) (1993). *Biomarkers and Risk Assessment: Concepts and Principles*, Geneva.
- Yang, X.; Song, Y.; Kai, J. e Cao, X. (2012). Enzymatic biomarkers of earthworms *Eisenia fetida* in response to individual and combined cadmium and pyrene. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 86, pp. 162–167.
- Yoshioka, Y.; Kitao, T.; Kishino, T.; Yamamuro, A. e Maeda, S. (2006). Nitric Oxide Protects Macrophages from Hydrogen Peroxide-Induced Apoptosis by Inducing the Formation of Catalase. *The Journal of Immunology*, 176, pp. 4675-4681.

Análise dos efeitos do diclofenac em concentrações ambientalmente realistas em *Hediste diversicolor* através de biomarcadores de stress oxidativo e peroxidação lipídica

Zhang, Y.; Geißen, S. e Gal, C. (2008). Carbamazepine and diclofenac: Removal in wastewater treatment plants and occurrence in water bodies. *Chemosphere*, 73, pp. 1151–1161.

Zuccato, E.; Calamari, D.; Natangelo, M. e Fanelli, R. (2000). Presence of therapeutic drugs in the environment. *The Lancet*, 355, pp. 1789-1790.