

Nazaré do Carmo Coelho

Efeitos ecotoxicológicos em peixes (*Salmo trutta fario*) expostos a concentrações ambientalmente realistas de omeprazol com recurso a biomarcadores de stress oxidativo e peroxidação lipídica

Faculdade Ciências da Saúde

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2022

Nazaré do Carmo Coelho

Efeitos ecotoxicológicos em peixes (*Salmo trutta fario*) expostos a concentrações ambientalmente realistas de omeprazol com recurso a biomarcadores de stress oxidativo e peroxidação lipídica

Faculdade Ciências da Saúde

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2022

Nazaré do Carmo Coelho

Efeitos ecotoxicológicos em peixes (*Salmo trutta fario*) expostos a concentrações ambientalmente realistas de omeprazol com recurso a biomarcadores de stress oxidativo e peroxidação lipídica

Atesto a originalidade do trabalho,

Nazaré do Carmo Coelho

(Nazaré do Carmo Coelho)

Dissertação apresentada à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, sob orientação do Prof. Doutor Alberto Teodorico Correia e coorientação do Doutor Bruno Nunes.

Porto, 2022

Este trabalho foi apresentado sob a forma de poster num congresso internacional:

Coelho, N., Nunes, B., Neves, J., Gonçalves, J. F., Daniel, D. & Correia, A.T. (2022). Ecotoxicological effects on fish (*Salmo trutta fario*) exposed to environmentally realistic concentrations of omeprazole. 32º Congresso da Sociedade Europeia de Fisiologia e Bioquímica (32nd ESCPB). 28-31 agosto. Nápoles, Itália.

RESUMO

Na década de 1980 surgiu uma classe de fármacos designada de inibidores da bomba de prótons (ATPase H^+K^+). O omeprazol foi o primeiro fármaco desta classe a ser introduzido no mercado para a profilaxia e tratamento de patologias associadas à produção excessiva de ácido gástrico. Por ser um fármaco eficaz, seguro e com poucos efeitos adversos, a sua prescrição abusiva, faz com que este e/ou seus metabolitos cheguem ao meio ambiente, em particular ao compartimento aquático. Após a sua toma, o omeprazol é metabolizado com formação de metabolitos secundários, nomeadamente omeprazol sulfona, omeprazol sulfito e hidroxiomeprazol. Após metabolização hepática, estes compostos são excretados, principalmente por via urinária, para os esgotos domésticos, que são posteriormente tratados por intermédio de estações de tratamento de águas residuais. Contudo, as estações de tratamento de águas residuais não são suficientemente eficazes na remoção completa destes compostos contribuindo para a sua entrada no meio aquático. Além disso, é também expectável a entrada no compartimento aquático do composto parental pelo descarte direto inapropriado. Este trabalho experimental teve por base a utilização de biomarcadores de stress oxidativo (catalase e glutatona-s-transferases) e de peroxidação lipídica (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico), com o intuito de determinar potenciais efeitos ecotoxicológicos em *Salmo trutta fario*, em particular nas brânquias e no fígado, resultantes da exposição crónica (28 dias) a concentrações ambientalmente realísticas de omeprazol parental (0,01, 0,1 e 1,0 $\mu\text{g/L}$). Pela análise dos resultados obtidos, estas concentrações não causaram efeitos bioquímicos adversos, pois não ocorreram alterações estatisticamente significativas nos animais sujeitos aos diferentes tratamentos. Na literatura são escassos os estudos acerca dos efeitos que este composto provoca a nível dos organismos aquáticos, sendo necessário a realização de novas pesquisas, nomeadamente o recurso a biomarcadores adicionais, tais como a superóxido dismutase e a glutatona peroxidase.

Palavras-chave: Fármaco, contaminação ambiental, biomarcadores, CAT, GSTs, TBARS, peixes, *Salmo trutta fario*

ABSTRACT

In the 1980s a class of drugs called proton pump inhibitors (ATPase H⁺K⁺) emerged. Omeprazole was the first drug of this class to be introduced in the market for the prophylaxis and treatment of pathologies associated with gastric acid overproduction. Being an effective, safe drug with few adverse effects, its abusive prescription causes it and/or its metabolites to reach the environment, particularly the aquatic compartment. After its intake, omeprazole is metabolized with the formation of secondary metabolites, namely omeprazole sulfone, omeprazole sulfite and hydroxyomeprazole. After hepatic metabolization, these compounds are excreted, mainly via urine, into the domestic sewage, which is subsequently treated via wastewater treatment plants. However, wastewater treatment plants are not sufficiently effective in completely removing these compounds, contributing to their entry into the aquatic environment. In addition, entry into the aquatic compartment of the parent compound by inappropriate direct disposal is also expected. This experimental work was based on the use of biomarkers of oxidative stress (catalase and glutathione-transferases) and lipid peroxidation (thiobarbituric acid reactive substances) in order to determine potential ecotoxicological effects in *Salmo trutta fario*, in particular in gills and liver, resulting from chronic exposure (28 days) to environmentally realistic concentrations of parental omeprazole (0.01, 0.1 and 1.0 µg/L). From the analysis of the results obtained, these concentrations did not cause adverse biochemical effects, as no statistically significant changes occurred in the animals subjected to the different treatments. In the literature there are few studies about the effects that this compound causes in aquatic organisms, requiring further research, including the use of additional biomarkers, such as superoxide dismutase and glutathione peroxidase.

Keywords: Drug, environmental contamination, biomarker, CAT, GSTs, TBARS, fish, *Salmo trutta fario*

AGRADECIMENTOS

À minha família e a todas as pessoas que se cruzaram comigo no meu percurso académico, o meu agradecimento.

Agradeço em especial ao meu orientador Prof. Doutor Alberto Correia, pela sua sabedoria, entusiasmo, dedicação e orientação durante o processo laboratorial, análise de dados estatísticos e revisão desta dissertação. Pela disponibilização dos recursos do Centro de Investigação Marinha e Ambiental (CIIMAR), o meu bem-haja!

De igual forma, agradeço ao Doutor Bruno Nunes, meu coorientador, pela sua contribuição neste trabalho.

Ao meu colega Eduardo Mota e ao Prof. Doutor José Neves obrigado por toda a ajuda ao longo do processo laboratorial.

Agradeço à Universidade Fernando Pessoa e a todos os docentes que fizeram parte deste plano de estudos.

Ao meu namorado, Tiago Gomes, que ao longo destes anos me apoiou e não me deixou em momento algum desistir dos meus objetivos.

Aos meus queridos avós que tanto anseiam a conclusão deste ciclo. Obrigado por me apoiarem!

Finalmente, aos mais importantes, aqueles que permitiram que chegasse até aqui.

Os meus pais. Obrigado por todo o esforço e por toda a paciência que tiveram ao longo destes anos, sem nunca duvidarem de mim!

A todos, o meu Bem-Haja...

ÍNDICE GERAL

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
AGRADECIMENTOS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiv
I. INTRODUÇÃO	1
1. Enquadramento geral.....	1
1.1 Principais classes fármaco-terapêuticas detetadas no meio ambiente e possíveis vias de contaminação ambiental.....	3
2. Inibidores da Bomba de Protões (IBP) – Omeprazol	7
2.1 Conceitos fisiológicos	7
2.1.1 Secreção ácida gástrica pela célula parietal.....	7
2.1.2 A bomba de protões gástrica	10
2.1.3 Funcionamento da bomba de protões	11
2.2 Classe fármaco-terapêutica- Inibidores da bomba de protões.....	12
2.2.1 Mecanismo de ação do omeprazol.....	13
2.2.2 Metabolização do omeprazol.....	14
3. Biomarcadores	15
3.1 Biomarcadores de stress oxidativo	17
3.1.1 Catalase.....	18

3.1.2 Glutationa-s-transferases	19
3.2 Biomarcadores de peroxidação lipídica: TBARS.....	20
4. Peixes: A sua importância enquanto organismos-teste em bioensaios.....	23
4.1 <i>Salmo trutta fario</i>	25
5. Objetivo	26
6. Material e métodos	26
6.1 Aquisição e acondicionamento dos peixes	26
6.2 Exposição ao omeprazol.....	26
6.3 Recolha e preparação dos tecidos/órgãos	27
6.4 Ensaio enzimáticos.....	28
6.4.1 Determinação da atividade da enzima CAT	28
6.4.2 Determinação da atividade das enzimas GSTs.....	29
6.4.3 Determinação da peroxidação lipídica (TBARS – Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico).....	29
6.4.4 Quantificação da proteína solúvel total	30
6.4.5 Análise Estatística	31
7. Resultados.....	32
7.1 Catalase.....	32
7.2 GSTs	33
7.3 TBARS	34
II. DISCUSSÃO	35
1. Catalase.....	36

2. GSTs	38
3. TBARS	39
III. CONCLUSÃO.....	42
IV. BIBLIOGRAFIA.....	44

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representação gráfica das classes fármaco-terapêuticas detetadas em maior quantidade (% relativa) no compartimento aquático (Santos <i>et al.</i> , 2010).....	4
Figura 2. Possíveis vias de chegada de fármacos ao meio ambiente (Bila e Dezotti, 2003)	5
Figura 3. A célula parietal (Ramsay e Carr, 2011).....	9
Figura 4. Representação da célula parietal, túbulo-vesículas e respectivas bombas de prótons ATPase H ⁺ K ⁺ (Otake <i>et al.</i> , 2016).....	11
Figura 5. Estrutura química dos IBPs comercializados em Portugal (Shin e Sachs, 2008).	13
Figura 6. Estruturas químicas do omeprazol, 5-hidroxiomeprazol, omeprazol sulfona e omeprazol sulfito (Shimizu <i>et al.</i> , 2006).....	15
Figura 7. Decomposição do peróxido de hidrogénio (atividade catalítica) em dois processos. (Gebicka e Krych-Madej, 2019).....	19
Figura 8. Etapas envolvidas no processo de peroxidação lipídica (Hashemi, 2019).....	22
Figura 9. Reação entre o ácido tiobarbitúrico (TBA) e o malonildialdeído (MDA) (Guillén-Sans e Guzmán-Chozas, 1998).	23
Figura 10. Resultados da atividade enzimática da catalase no fígado (A) e nas brânquias (B). Os resultados são apresentados como valores médios referentes a cada tratamento ± erro padrão. Não foram evidenciadas alterações significativamente estatísticas entre os tratamentos (análise de variância unifatorial; P > 0,05).	32
Figura 11. Resultados referentes à atividade das enzimas GSTs no fígado (A) e nas brânquias (B) em indivíduos de <i>Salmo trutta fario</i> após exposição crónica (28 dias) a diferentes concentrações de omeprazol. Os resultados são apresentados como valores médios referentes a cada tratamento ± erro padrão. Não foram comprovadas alterações	

significativamente estatísticas entre os grupos estudados (análise de variância unifatorial: $P > 0,05$) 33

Figura 12. Valores referentes ao método TBARS no fígado (A) e nas brânquias (B). Os valores são apresentados como valores médios referentes a cada tratamento \pm erro padrão. Não foram comprovadas alterações significativamente estatísticas entre os diferentes tratamentos (análise de variância unifatorial: $P > 0,05$) 34

LISTA DE ABREVIATURAS

AINES	Anti-inflamatórios não esteroides
AMPC	3'5'-AMP cíclico
ATP	Adenosina trifosfato
ATPase H⁺ K⁺	Bomba de prótons
Ca²⁺	Ião cálcio
CAT	Catalase
CBDN	1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
CCK-2	Recetores colecistoquinina tipo 2
Cl⁻	Ião cloro
Cuⁿ⁺	Iões cobre
CYP	Sistema Citocromo P450
DRGE	Doença de refluxo gastroesofágico
ECL	Células semelhantes às enterocromafinas
ERO	Espécies reativas de oxigénio
ETARes	Estações de tratamento de águas residuais
Feⁿ⁺	Iões ferro
GPX	Glutationa peroxidase
GREP	Glutationa-redutase
GSH	Glutationa na forma reduzida

GSTs	Glutationa-S-Transferases
H⁺	Ião hidrogénio
H₂CO₃	Ácido carbónico
H₂O	Água
H₂O₂	Peróxido de hidrogénio
HCl	Ácido clorídrico
HCO₃	Bicarbonato
IBP	Inibidores da bomba de protões
K⁺	Ião potássio
MDA	Malondialdeído
O₂	Oxigénio molecular
O₂⁻	Radical superóxido
OH[·]	Radical hidroxilo
OMS	Organização Mundial de Saúde
PGE₂	Prostaglandinas do tipo E ₂
PL	Peroxidação lipídica
RO[·]	Radical alcóxido
ROO[·]	Radical peróxido
SOD	Superóxido dismutase
SST	Somatostatina
TBA	Ácido tiobarbitúrico

TBARS Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TVS Túbulo-vesículas

I. INTRODUÇÃO

1. Enquadramento geral

Devido ao aumento da população mundial, ao crescente investimento no setor da saúde e ao desenvolvimento de novos medicamentos (der Beek *et al.*, 2016), os fármacos são cada vez mais utilizados, quer na medicina humana, quer na medicina veterinária, tanto a nível do tratamento de doenças, como da sua prevenção (Christen *et al.*, 2010; der Beek *et al.*, 2016). Tal facto contribuiu para a sua deteção nos diferentes ecossistemas, em particular no meio aquático, ocasionado uma redução da qualidade das diversas matrizes ambientais, tais como água, sedimento, ar e solo, ameaçando assim a saúde dos seres vivos que habitam nesses ecossistemas (Cajaraville *et al.*, 2000; Bila e Dezotti, 2003; Jesus e de Carvalho, 2008; Li *et al.*, 2008).

Esta preocupação conduziu a um crescente aumento dos estudos e publicações científicas sobre o impacto que os fármacos, seus derivados, e os produtos de higiene pessoal têm no meio ambiente (Caliman e Gavrilescu, 2009), de forma a avaliar os potenciais riscos para o biota relacionados com o seu uso, assim como para avaliar a eficácia, segurança e qualidade dos produtos em questão (Knacker e Metcalfe, 2010).

Existem diversas fontes que contribuem para a chegada de produtos farmacêuticos ao meio ambiente, destacando-se a ação antropogénica (De Oliveira e De Souza, 2006). Após administração e metabolização pelo organismo, a eliminação dos produtos farmacêuticos é feita pela excreção, via urina e fezes, nas águas residuais (esgotos domésticos) (Bila e Dezotti, 2003; Fent *et al.*, 2006). Estes afluentes são direcionados para as estações de tratamento de águas residuais (ETARes), para posterior tratamento, sendo detetados frequentemente, fármacos e/ ou metabolitos em concentrações de µg/L e ng/L (Heberer, 2002; Bila e Dezotti, 2007; Corcoran *et al.*, 2010). Contudo a remoção destes compostos nas ETARes não é eficaz (Nunes, 2011) chegando assim muitos deles inalterados ao compartimento aquático (Bila e Dezotti, 2007).

Os inibidores da bomba de prótons (IBP), representam uma classe de fármacos desenvolvidos para o tratamento de patologias relacionadas com a produção de ácido gástrico. Diretrizes clínicas recomendam a sua prescrição para o tratamento de doença de

refluxo gastroesofágico (DRGE) e úlcera gástrica e duodenal (Lundell *et al.*, 2015), assim como adjuvante do tratamento com anti-inflamatórios não esteroides (AINES) a fim de evitar efeitos adversos (Hernández e Ibáñez, 2011). Fármacos desta classe são os mais potentes ao nível da inibição da secreção gástrica em comparação com outras classes disponíveis, sendo também bem tolerados e com taxas de eventos adversos reduzidas (entre 1-3%) (Lundell *et al.*, 2015). A sua elevada eficácia e bom perfil de segurança (Lundell *et al.*, 2015), baixa toxicidade (Martins *et al.*, 2019) assim como a elevada prevalência da DRGE em países ocidentais (El-Serag *et al.*, 2014), contribui para que seja uma das classes de medicamentos mais prescrita (Kosma *et al.*, 2016). O omeprazol foi o primeiro fármaco desta classe a ser utilizado na terapêutica (Kosma *et al.*, 2017), sendo que o seu mecanismo de ação envolve a inibição do funcionamento da bomba de prótons ATPase H⁺K⁺ gástrica presente nas células parietais, da qual resulta uma redução da secreção de ácido gástrico (ácido clorídrico) (Sachs *et al.*, 2006).

O sistema enzimático CYP450 existente no fígado, é responsável pela metabolização deste composto em cerca de 80% (Roche, 2006), sendo este excretado maioritariamente sobre a forma de metabolitos na urina (Kosma *et al.*, 2017). A sua presença no meio aquático pode ser prejudicial à saúde dos seres vivos expostos, uma vez que pode desencadear reações redox nos organismo, das quais resultam radicais livres (der Oost *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2009).

Como defesa, as células dos organismos são dotadas de um complexo sistema de defesa, o qual inclui mecanismos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (De Oliveira e De Souza, 2006; Li *et al.*, 2009), responsáveis por manter uma situação de equilíbrio relativamente à produção de radicais livres (Andrade *et al.*, 2010). Quando o equilíbrio é quebrado, ou ocorre uma diminuição significativa da eficiência das enzimas antioxidantes (Correia *et al.*, 2019), é produzida uma grande quantidade de radicais livres, nomeadamente espécies reativas de oxigénio (ERO), conduzindo consequentemente a um cenário de stress oxidativo (Andrade *et al.*, 2010). Outra consequência do aumento da produção de ERO é o processo de peroxidação lipídica (PL), induzida pelo stress oxidativo nos lípidos, que pode ser bastante prejudicial uma vez que leva à alteração das propriedades biológicas das membranas, comprometendo todo o seu funcionamento (Vannucchi *et al.*, 1998). A alteração da atividade destas enzimas antioxidantes pode ser utilizada como biomarcador de stress oxidativo (der Oost *et al.*, 2003).

1.1 Principais classes fármaco-terapêuticas detetadas no meio ambiente e possíveis vias de contaminação ambiental

Na União Europeia estima-se que são utilizados na prática da medicina um número superior a 3000 substâncias diferentes, maioritariamente fármacos, (Fent *et al.*, 2006; Christen *et al.*, 2010), contribuindo para a sua presença a nível do meio aquático (Bila e Dezotti, 2007).

A vulnerabilidade do meio ambiente a substâncias químicas depende de vários fatores, nomeadamente: a) das propriedades físicas e químicas dos contaminantes e dos produtos resultantes da sua transformação; b) da concentração de contaminantes que chega ao ecossistema; c) da duração e do tipo de descarga dos contaminantes podendo esta ser intermitente ou contínua; d) das propriedades dos ecossistemas que lhes permite resistir às alterações resultantes da presença dos contaminantes (tamponamento da água, por exemplo); e) da concentração de matéria orgânica dissolvida na água; f) da localização do ecossistema em relação ao sítio de lançamento de contaminantes (Costa *et al.*, 2008).

Através de técnicas analíticas, são detetados mundialmente (Bila e Dezotti, 2007), fármacos e produtos de higiene pessoal (Weigel *et al.*, 2002; Corcoran *et al.*, 2010; Pal *et al.*, 2010), em diferentes matrizes ambientais sendo as mais frequentes os efluentes das ETARes, as águas naturais, os solos, os sedimentos e o lodo biológico (der Oost *et al.*, 2003; Fent *et al.*, 2006; Bila e Dezotti, 2007).

Como resultado, são diversas as classes terapêuticas detetas no compartimento aquático, sendo as principais os antibióticos, as hormonas, os anti-inflamatórios não esteroides (AINES), os antiepiléticos, os β -bloqueadores e os agentes antidislipidémicos. De salientar que existem outras classes farmacêuticas igualmente reportadas (Heberer, 2002; Weigel *et al.*, 2002; Fent *et al.*, 2006; Calisto e Esteves, 2009; Christen *et al.*, 2010; Corcoran *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2010) (Figura 1).

Efeitos ecotoxicológicos em peixes (*Salmo trutta fario*) expostos a concentrações ambientalmente realistas de omeprazol com recurso a biomarcadores de stress oxidativo e peroxidação lipídica

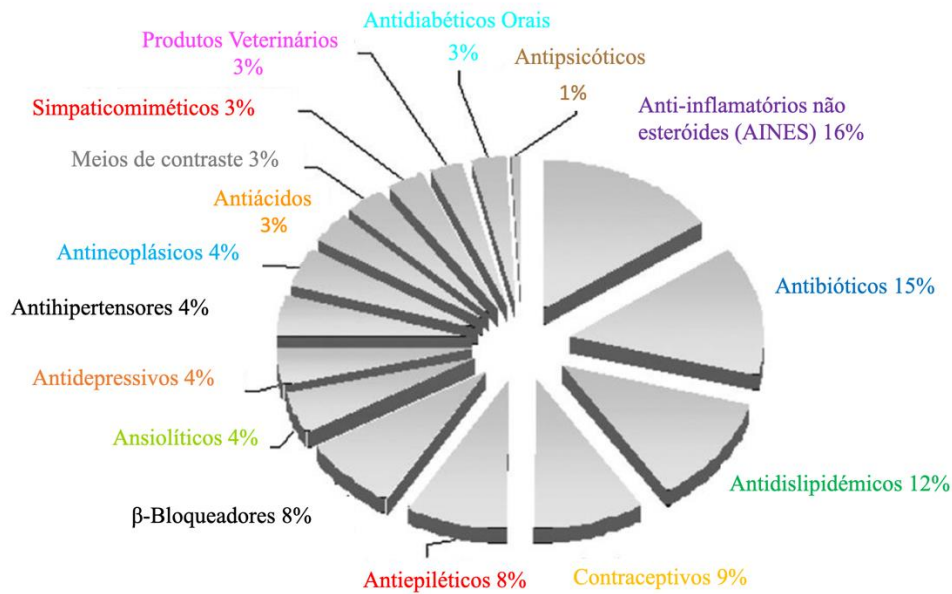


Figura 1. Representação gráfica das classes fármaco-terapêuticas detetadas em maior quantidade (% relativa) no compartimento aquático (Santos *et al.*, 2010)

A classe terapêutica dos IBP apresenta, atualmente, um elevado consumo mundial (Kosma *et al.*, 2016). Com o aparecimento do omeprazol, a sua prescrição para tratamento de doenças digestivas tornou-se comum. Devido ao seu baixo custo e à sua elevada eficácia (redução da secreção ácida em 95%) (Costa e Damascena, 2020), o omeprazol é considerado um dos 40 fármacos mais vendidos nos países nórdicos (Kosma *et al.*, 2016). Em Portugal, está entre os 10 compostos mais prescritos no tratamento de patologias gastro digestivas (Gomes e Simon, 2017). Apesar do seu elevado consumo, a sua extensa metabolização contribui para que a deteção de omeprazol parental em águas residuais urbanas e águas ambientais seja relativamente baixa (até 20%) (Boix *et al.*, 2014), no entanto são detetados frequentemente metabolitos deste composto (Kosma *et al.*, 2016), podendo estes causar efeitos tóxicos na vida aquática (Fent *et al.*, 2006).

A entrada deste e de outros fármacos no meio ambiente, sobretudo no compartimento aquático ocorre por inúmeras vias (Weigel *et al.*, 2002) (Figura 2). A libertação de compostos pelas indústrias farmacêuticas (Bila e Dezotti, 2003) e efluentes de hospitais (Fent *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2008; Madureira *et al.*, 2010), são alguns dos exemplos.

Como referido anteriormente, após administração e respetiva metabolização, os fármacos e seus metabolitos são eliminados do organismo através da urina e das fezes nos esgotos domésticos (Bila e Dezotti, 2007). Nestes, assim como no lixo doméstico, são também, muitas das vezes descartados substâncias não utilizadas na terapêutica ou cujo prazo de validade tenha sido ultrapassado contribuindo assim com mais uma fonte de poluição (Pal *et al.*, 2010; McEneff *et al.*, 2015).

As propriedades físicas e químicas dos compostos farmacêuticos (Kümmerer *et al.*, 1997), assim como a falta de equipamentos adequados para a sua eliminação (Bisognin *et al.*, 2018), faz com que a remoção destes nas ETARes não seja totalmente eficaz (Petrović *et al.*, 2003; Rosal *et al.*, 2010), justificando assim a presença de fármacos em águas superficiais (DellaGreca *et al.*, 2006), tais como rios e lagos, em águas subterrâneas e até na água potável (Fent *et al.*, 2006; Larsson *et al.*, 2007).

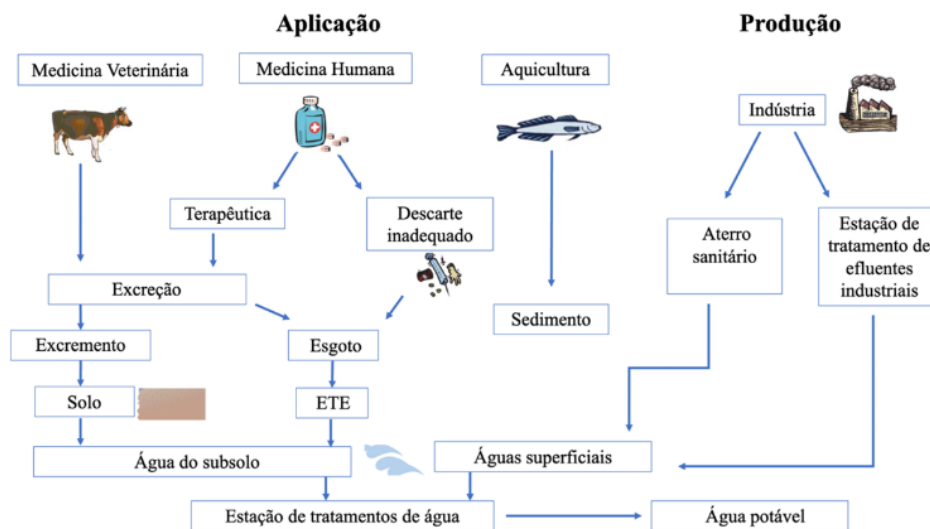


Figura 2. Possíveis vias de chegada de fármacos ao meio ambiente (Bila e Dezotti, 2003)

Outra fonte de contaminação por estes produtos, bastante comum, é a utilização de medicamentos para criação de animais (Regitano e Leal, 2010), sendo utilizado, posteriormente, na agricultura o excremento do animal como fertilizante dos solos (Arikan *et al.*, 2008; Corcoran *et al.*, 2010; Ribeiro e Américo-Pinheiro, 2018). Esta prática contribui para a chegada de substâncias poluentes ao solo, e as águas superficiais e subterrâneas (McEneff *et al.*, 2015).

Os antibióticos são a classe de fármacos mais utilizada na produção de gado e na produção avícola, como promotores de crescimento, a fim de assegurar a produtividade e a competição da produção animal, sendo também utilizados como aditivos de alimento na aquicultura (Bila e Dezotti, 2003; Arikan *et al.*, 2008; Regitano e Leal, 2010). No entanto o uso excessivo de antibióticos acarreta duas consequências ambientais: contaminação dos recursos hídricos e fenómenos de resistência por parte de bactérias (Bila e Dezotti, 2003).

Num estudo realizado por Hamscher *et al.* (2022) foram detetadas quantidades significativas de tetraciclina e clortetraciclina, em estrume de animais que serviu de fertilizante dos solos. Com este estudo foi possível concluir-se que a entrada destes antibióticos no solo deveu-se à utilização de fezes contaminadas. No solo, esta classe de fármacos possui uma tendência para se acumular persistindo no meio ambiente. Como consequência, pode ocorrer a passagem destes compostos para a água através de processos de lixiviação e contaminação de aquíferos por via do ciclo da água (Hamscher *et al.*, 2002; Weigel *et al.*, 2002).

Na China são regularmente detetadas grandes quantidades de fármacos em águas superficiais, devido ao elevado consumo de medicamentos fruto do envelhecimento da população, e pelo facto de serem um dos maiores produtores de produtos farmacêuticos (Duan *et al.*, 2020). As substâncias medicamentosas (nomeadamente antibióticos, antiácidos e antidepressivos) aparecem em descargas de fábricas de produção farmacêutica recém estabelecidas, nomeadamente antibióticos, antiácidos e antidepressivos. Além disso, nestes países os regulamentos que regem o impacto ambiental dos produtos farmacêuticos são menos exigentes em relação a outros regulamentos existentes na Europa, no Japão e na América do Norte, que têm como função avaliar o destino ambiental e efeito biológico de qualquer produto farmacêutico antes de ser introduzido no mercado (Corcoran *et al.*, 2010).

Efeitos ecotoxicológicos em peixes (*Salmo trutta fario*) expostos a concentrações ambientalmente realistas de omeprazol com recurso a biomarcadores de stress oxidativo e peroxidação lipídica

Um estudo realizado por Miao *et al.* (2002) detetou igualmente a presença significativa de fármacos em efluentes provenientes de estações de tratamento de águas residuais no Canadá, nomeadamente fenoprofeno, bezafibrato, diclofenac, gemfibrozil, naproxeno, ibuprofeno e indometacina. Segundo este autor, os compostos identificados provêm na maioria das vezes dos hospitais. Alguns compostos utilizados no âmbito hospitalar têm a particularidade de se ligarem a halogéneos tornando-se persistentes no meio ambiente sendo também capazes de sofrer bioacumulação ao longo das cadeias tróficas (Kümmerer *et al.*, 1998).

2. Inibidores da Bomba de Protões (IBP) – Omeprazol

2.1 Conceitos fisiológicos

2.1.1 Secreção ácida gástrica pela célula parietal

Uma das principais funções do estômago é a preparação dos alimentos para a digestão e respetiva absorção a nível intestinal (Jain *et al.*, 2007; Ramsay e Carr, 2011). Para tal, é necessário a produção de ácido gástrico (ácido clorídrico), que para além de auxiliar a digestão, permite também aumentar a absorção de minerais tais como o ferro, o cálcio, e a vitamina B12, entre outros. Para além destas funções, o ácido clorídrico produzido elimina microrganismos nocivos ao organismo, particularmente as bactérias (Schubert, 2004; Cui e Waldum, 2007), sendo ainda responsável pela conversão do pepsinogénio em pepsina (Schubert, 2017).

Apesar da sua existência ser benéfica para o organismo, a produção excessiva de ácido clorídrico coloca em causa a integridade da mucosa gástrica, podendo levar ao desenvolvimento de determinadas patologias (Schubert, 2004; Engevik *et al.*, 2020). Para que tal não aconteça, é necessário estabelecer-se um equilíbrio entre a secreção ácida produzida e os mecanismos de proteção da mucosa gástrica (Engevik *et al.*, 2020). Este equilíbrio é mantido pela normal regulação da secreção do ácido através de vias aferentes e eferentes do sistema nervoso central e entérico, assim como por vias autócrinas, parácrinas e hormonais (Tanaka *et al.*, 2002; Yao e Forte, 2003; Schubert, 2004; Cui e Waldum, 2007; Jain *et al.*, 2007).

Efeitos ecotoxicológicos em peixes (*Salmo trutta fario*) expostos a concentrações ambientalmente realistas de omeprazol com recurso a biomarcadores de stress oxidativo e peroxidação lipídica

Estas vias de secreção convergem em quatro tipos de células: Células parietais ou oxínticas responsáveis pela produção ácido clorídrico; Células D da mucosa oxíntica e pilórica responsáveis pela produção de somatostatina (um inibidor parácrino da secreção ácida); Células G da mucosa pilórica responsáveis pela produção de gastrina; e Células semelhantes às enterocromafinas (ECL) responsáveis pela produção de histamina (Schubert, 2004; Cui e Waldum, 2007).

Para que ocorra produção do ácido gástrico é necessário a estimulação da célula parietal. (Yao e Forte, 2003). Os principais estímulos que atuam nestas células são a gastrina, histamina e a acetilcolina (Tanaka *et al.*, 2002; Yao e Forte, 2003) (Figura 3).

No ser humano, a estimulação da secreção de gastrina pelas células G ocorre devido a estímulos alimentares e químicos (Leme *et al.*, 2003). A sua atuação nas células parietais pode ocorrer de forma direta, pela ligação a recetores colecistoquinina tipo 2 (CCK-2), ou de forma indireta, pela ligação a recetores CCK-2 existentes nas ECL, da qual resulta a libertação de histamina (Tanaka *et al.*, 2002; Schubert, 2017). A histamina atua como mediador parácrino, distribuindo-se para as células parietais vizinhas ocorrendo a ligação da mesma aos recetores de histamina (H₂) (Brunton e Brunton, 2012; Schubert, 2017).

Outro estimulador da célula parietal é a acetilcolina, que atua pela ativação dos recetores muscarínicos-3 (M3) (Schubert, 2017) nas células parietais, e/ou pela estimulação da libertação de histamina nas células ECL por meio de ativação dos recetores M1 (Tanaka *et al.*, 2002; Schubert, 2004).

Da ligação destas substâncias estimulantes aos respetivos recetores existentes na membrana basal da célula parietal resulta o processo de ativação de secreção do ácido clorídrico através de um aumento da concentração de dois mensageiros: o cálcio livre citosólico [Ca²⁺] e o 3'5'-AMP cíclico (AMPC) monofosfato cíclico de adenosina (Sachs e Wallmark, 1989).

A gastrina, a histamina e a acetilcolina atuam como estimulantes da secreção de ácido clorídrico através de um aumento de concentração de cálcio intracelular [Ca²⁺]. No entanto, a ocorrência do aumento da concentração de AMPC deve-se à libertação de histamina pela atuação da gastrina e da acetilcolina nas células parácrinas (Schubert, 2017). A histamina é por sua vez mediada pela ativação da adenilciclase, conseguindo

Efeitos ecotoxicológicos em peixes (*Salmo trutta fario*) expostos a concentrações ambientalmente realistas de omeprazol com recurso a biomarcadores de stress oxidativo e peroxidação lipídica

assim aumentar os níveis de AMPc necessários à síntese de ácido (Savarino *et al.*, 2009; Golan *et al.*, 2012).

Quando existem concentrações suficientes dos mensageiros referenciados, ocorre a ativação da bomba de prótons ATPase H^+K^+ , seguida da ativação das cascatas de proteína quinase. Esta ativação culmina numa translocação da bomba do citoplasma até à membrana plasmática apical da célula parietal, através da subunidade beta (β) (Yao e Forte, 2003; Schubert, 2004; Roche, 2006).

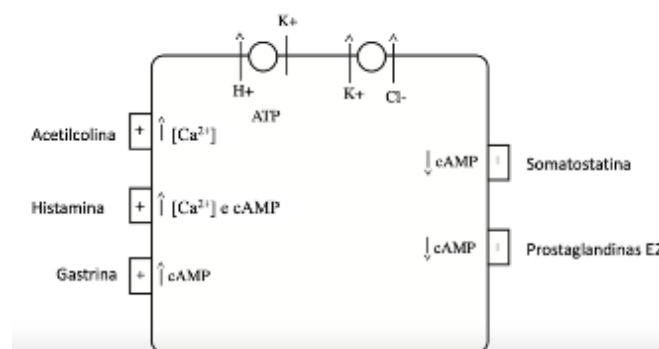


Figura 3. A célula parietal (Ramsay e Carr, 2011).

Após suficiente secreção do ácido, esta é terminada por um sistema de feedback negativo.

A diminuição do pH intra-gástrico estimula a produção de somatostatina (SST) pelas células D (Savarino *et al.*, 2009). A somatostatina é uma hormona com capacidade de inibir as fases que levam à ativação das células parietais. Esta inibição deve-se à ligação a recetores específicos (SST2), que se localizam nas células G, nas ECL e nas células parietais. Resulta, assim uma inibição sobre a produção das substâncias estimuladoras (Wilson e Stevenson, 2019).

A formação de prostaglandinas do tipo E2 (PGE2), através ácido araquidónico pelas enzimas cicloxigenase (COX-1), é outro mecanismo de inibição de secreção acida, dado que estas quando formadas, ligam-se a recetores específicos E3, inibindo assim a formação do ácido, e estimulando a produção de bicarbonato e muco (Rang *et al.*, 2016).

2.1.2 A bomba de prótons gástrica

A bomba de prótons ATPase $H^+ K^+$ gástrica é uma grande proteína tipo P2 (Shin e Sachs, 2008), composta por duas subunidades: a subunidade alfa (α) responsável pela realização de funções catalíticas e troca de íons entre o lúmen e o citoplasma (Roche, 2006) e a subunidade beta (β) cuja função é proteger a enzima da sua degradação e também o seu deslocamento entre o citoplasma e a membrana da célula parietal (Sachs e Wallmark, 1989; Schubert, 2004; Roche, 2006; Golan *et al.*, 2012; Inatomi *et al.*, 2016).

Contrariamente a outros órgãos, o estômago é o único local onde se manifestam quantidades significativas de bombas gástricas constituídas pelas duas subunidades. Tal facto faz com que estas bombas de prótons ATPase H^+K^+ gástricas presentes nas células parietais do estômago sejam o alvo principal de atuação dos fármacos desenvolvidos para inibir o excesso de ácido gástrico (National Research Council, 1987; Herrmann *et al.*, 2007; Inatomi *et al.*, 2016), ocupando estas, nas células parietais diferentes localizações dependendo do estado em que se encontram (Forte e Zhu, 2009).

A célula parietal contém no seu citoplasma estruturas designadas de túbulo-vesículas (TVS), que num momento de repouso, ou seja, de não produção de ácido, se encontram acopladas de bombas de prótons ATPase H^+K^+ gástricas (National Research Council, 1987; Forte e Zhu, 2009; Engevik *et al.*, 2020) (Figura 4).

Com a estimulação da célula, ocorre a fusão dos TVS com os canalículos secretores da membrana apical (Forte e Zhu, 2009) e a translocação das bombas para as extremidades das microvilosidades dos canalículos secretores (National Research Council, 1987; Yao e Forte, 2003; Sachs *et al.*, 2006; Forte e Zhu, 2009). Adicionalmente, são também transcolados os canais de potássio (K^+) e de cloro (Cl^-), permitindo assim a existência de K^+ nos canalículos secretores que leva à ativação das bombas de prótons gástricas (National Research Council, 1987).

Efeitos ecotoxicológicos em peixes (*Salmo trutta fario*) expostos a concentrações ambientalmente realistas de omeprazol com recurso a biomarcadores de stress oxidativo e peroxidação lipídica

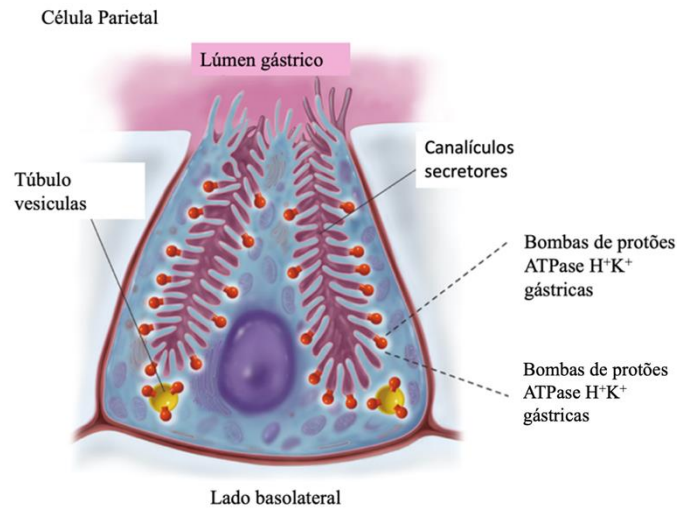


Figura 4. Representação da célula parietal, túbulo-vesículas e respetivas bombas de protões ATPase H⁺K⁺ (Otake *et al.*, 2016).

2.1.3 Funcionamento da bomba de protões

A bomba de protões ATPase H⁺K⁺ gástrica é responsável pela troca de iões de hidrogénio (H⁺) entre o citoplasma da célula parietal e as extremidades das microvilosidades dos canalículos secretores e os iões K⁺ (Sachs *et al.*, 2006), sendo os iões H⁺ provenientes da reação entre o dióxido de carbono e a água pela anidrase carbónica, da qual resulta primeiramente ácido carbónico (H₂CO₃) (Mescher, 2018). Este ácido ao sofrer ionização dá origem a bicarbonato (HCO₃⁻) e iões H⁺ (Sachs e Wallmark, 1989).

Para a execução da troca de iões H⁺ por iões K⁺ existentes nas extremidades das microvilosidades dos canalículos secretores, a bomba de protões gástrica requer energia e fosfato. Energia essa que resulta da hidrólise do ATP (National Research Council, 1987; Laloo *et al.*, 2021).

Quando ocorre fosforilação da bomba de protões, os iões H⁺ são transportados para as extremidades das microvilosidades dos canalículos secretores e, quando ocorre desfosforilação, os iões de K⁺ existentes nos canalículos são transportados para o citoplasma da célula parietal.

Efeitos ecotoxicológicos em peixes (*Salmo trutta fario*) expostos a concentrações ambientalmente realistas de omeprazol com recurso a biomarcadores de stress oxidativo e peroxidação lipídica

De modo a contrabalançar a saída dos iões de H^+ do citoplasma para os canalículos secretores, os iões de HCO_3^- são deslocados a favor do gradiente de concentração, do citoplasma para o fluido extracelular. Consequentemente, ocorre a entrada de iões de Cl^- na célula parietal, que são direcionados para as extremidades das microvilosidades dos canalículos secretores. Aqui, através dos canais de Cl^- , estes iões são direcionados para o lúmen gástrico. Com a saída dos iões Cl^- e H^+ dos canalículos para o lúmen gástrico, estes iões combinam-se dando origem ao ácido clorídrico responsável pela acidificação do pH gástrico (1-3) (Seeley *et al.*, 2011; Mescher, 2018; Laloo *et al.*, 2021).

2.2 Classe fármaco-terapêutica- Inibidores da bomba de prótons

Na década de 1980, surgiu pela primeira vez uma classe fármaco-terapêutica designada de inibidores da bomba de prótons, sendo introduzido no mercado, em 1989, o primeiro fármaco desta classe o omeprazol (Inatomi *et al.*, 2016; Kosma *et al.*, 2016; Okamoto *et al.*, 2018). Em Portugal, este grupo farmacoterapêutico é atualmente constituído pelos seguintes fármacos: omeprazol, lansoprazol, esomeprazol, pantoprazol e rabeprazol (CIM, 2017; Brisebois *et al.*, 2018) (Figura 5).

O seu aparecimento alterou completamente o tratamento de patologias que tinham por base a secreção excessiva de ácido clorídrico (Lundell *et al.*, 2015), dado o seu elevado grau de eficácia em comparação com outros fármacos já existentes (inibição de 80-95% das bombas de prótons ATPase H^+K^+ (Chagas *et al.*, 2020).

São utilizados em diversas patologias gastrointestinais tais como: úlcera gastroduodenal, esofagite de refluxo, síndrome de Zollinger Ellison e na terapia de erradicação de *Helicobacter pylori* (Heberer, 2002; Bila e Dezotti, 2007; Bosch *et al.*, 2007).

Todos os IBP contêm na sua estrutura um farmacóforo designado de “ α -piridilmetilsulfinilbenzimidazol”, diferindo entre si na natureza dos substituintes existentes nos anéis de piridina e benzimidazol que constituem cada molécula (Kosma *et al.*, 2016), estando estes ligados por um grupo metilenossulfinil ($-CH_2SO-$) ou imidazipidina (Sachs *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2008), dividindo assim os IBPs em benzimidazóis (todos os fármacos referidos anteriormente) e imidazopiridinas (tal como o tenatoprazol, composto que está em avaliação pré-clínica) (Sachs *et al.*, 2006).

Efeitos ecotoxicológicos em peixes (*Salmo trutta fario*) expostos a concentrações ambientalmente realistas de omeprazol com recurso a biomarcadores de stress oxidativo e peroxidação lipídica

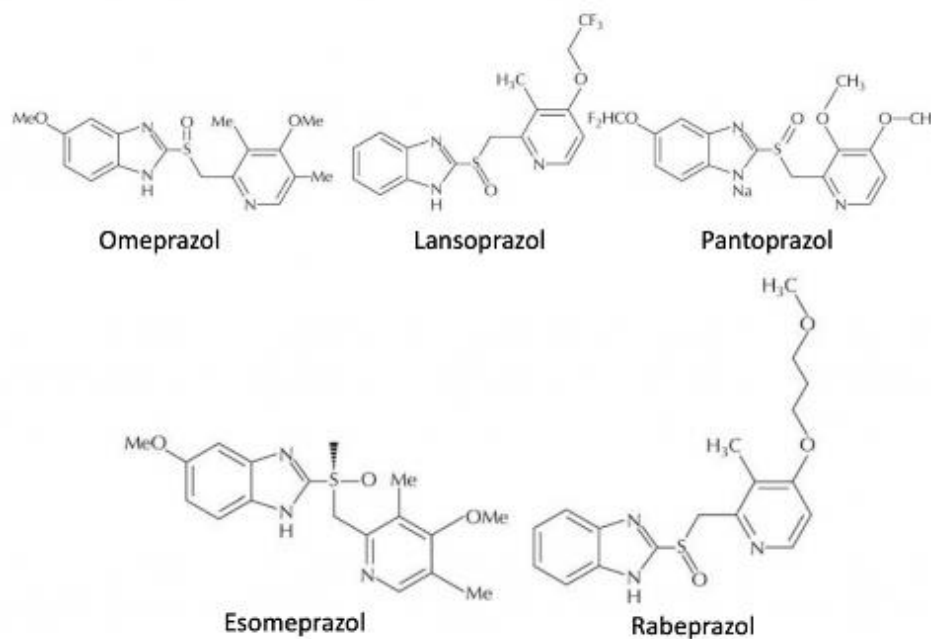


Figura 5. Estrutura química dos IBPs comercializados em Portugal (Shin e Sachs, 2008).

2.2.1 Mecanismo de ação do omeprazol

Os IBP inibem a bomba de prótons ATPase H^+K^+ gástrica através da ligação a resíduos de cistina existentes na mesma (Sachs *et al.*, 2006). Tal como todos os IBP existentes em Portugal, o omeprazol é um composto que apresenta características lipofílicas e é administrado sobre a forma de pro-fármaco (Roche, 2006). Por ser uma base fraca lipofílica, este composto consegue atravessar as membranas celulares e chegar facilmente às células parietais (Sachs *et al.*, 2006; Okamoto *et al.*, 2018), sendo estas o único local do organismo onde o pH é inferior a 4 (Sachs *et al.*, 2006; Shin and Howden, 2006).

No citoplasma da célula parietal, o fármaco permanece inativo, devido ao pH neutro, mas nas extremidades das microvilosidades dos canalículos secretores, onde o pH é aproximadamente 1, este torna-se ativo (Sachs *et al.*, 2006; Brunton e Brunton, 2012).

Por ser administrado sob a forma de pro-fármaco, o omeprazol, tem de sofrer protonação a fim de se tornar um fármaco farmacologicamente ativo. Para tal, ocorrem duas

Efeitos ecotoxicológicos em peixes (*Salmo trutta fario*) expostos a concentrações ambientalmente realistas de omeprazol com recurso a biomarcadores de stress oxidativo e peroxidação lipídica

protonações e um arranjo espontâneo dando origem a uma sulfonamida ativa ou a derivados do ácido sulfénico (Roche, 2006).

A primeira protonação do omeprazol ocorre a nível do nitrogénio da piridina seguindo-se uma segunda protonação na porção benzimidazol (N₃) do fármaco (Roche, 2006; Ward e Kearns, 2013). Promove-se de seguida um arranjo químico que origina um ácido sulfénico ou uma sulfenamida tetracíclica (forma ativa do fármaco) (Cederberg *et al.*, 1989; Brunton e Brunton, 2012). A forma ativa contém energia suficiente para reagir covalentemente com o grupo sulfidrílico de cisteínas presente na ATPase H⁺K⁺ gástrica, da qual resulta uma ligação dissulfeto inativando irreversivelmente a bomba de prótons ATPase H⁺K⁺ gástrica (Sachs *et al.*, 2006; Ward e Kearns, 2013).

2.2.2 Metabolização do omeprazol

O omeprazol é um fármaco que sofre forte efeito de primeira passagem (Cederberg *et al.*, 1989), ou seja, uma elevada metabolização. Esta é da responsabilidade do sistema enzimático do citocromo P450, como já referido anteriormente, mais propriamente das enzimas CYP2C19 e CYP3A4 (Lasker *et al.*, 1998; Shi e Klotz, 2008; Engevik *et al.*, 2020). Do processo de metabolização resulta a formação de vários metabolitos, sendo estes inativos (Kosma *et al.*, 2016) (Figura 6).

O omeprazol é maioritariamente metabolizado pela enzima CYP2C19 (Bosch *et al.*, 2007) dando origem a hidroxioimeprazol (5-OH OME), principal metabolito no plasma e ao 5-desmetilomeprazol. Outra fração é metabolizada pelo CYP3A4 originando diversos metabolitos, sendo o principalmente omeprazol sulfona (Bosch *et al.*, 2007; Shi e Klotz, 2008).

De salientar que ainda é desconhecida a enzima que participa na metabolização da qual resulta o omeprazol sulfito. Estes metabolitos são maioritariamente eliminados por via urinária (77%) e os restantes pelas fezes implicando uma excreção biliar (Kosma *et al.*, 2016).

Efeitos ecotoxicológicos em peixes (*Salmo trutta fario*) expostos a concentrações ambientalmente realistas de omeprazol com recurso a biomarcadores de stress oxidativo e peroxidação lipídica

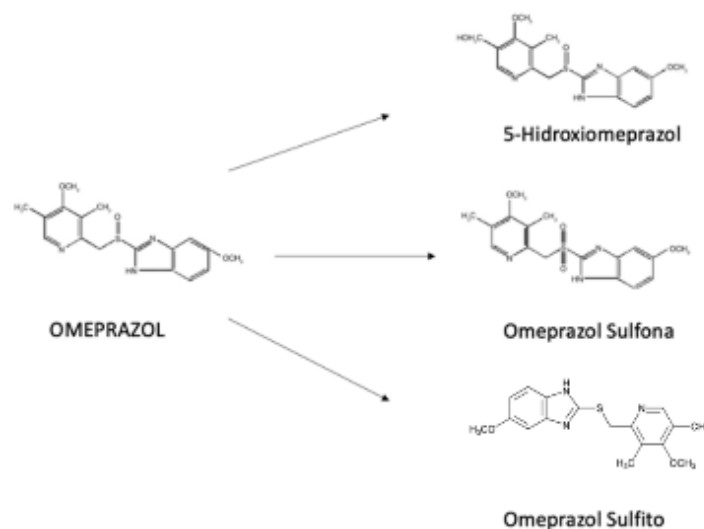


Figura 6. Estruturas químicas do omeprazol, 5-hidroxiomeprazol, omeprazol sulfona e omeprazol sulfito (Shimizu *et al.*, 2006).

3. Biomarcadores

As regulamentações ambientais têm-se focado cada vez mais no risco que os contaminantes emergentes representam para o meio ambiente, sobretudo para o compartimento aquático. Para tal recorre-se muitas vezes a estudos com biomarcadores, os quais permitem avaliar danos causados por esses compostos em organismos vivos (Islas-Flores *et al.*, 2013), através de medições efetuadas a nível dos fluidos biológicos dos organismos e/ou através de células-tecidos (National Research Council, 1987).

No ramo da ecotoxicologia, os biomarcadores são interpretados como parâmetros que podem sofrer alterações significativas nos organismos após exposição a contaminantes (Rodrigues *et al.*, 2011). Esses parâmetros podem ser alterações bioquímicas, fisiológicas ou morfológicas mensuráveis associadas à exposição a um agente tóxico (Jesus e de Carvalho, 2008; Islas-Flores *et al.*, 2013).

O termo biomarcador foi redefinido por Van Gestel e Van Brummelen (1994) como qualquer resposta biológica a um xenobiótico que é medida dentro de um organismo ou em produtos deste, tais como urina, fezes, cabelo, penas, entre outros, indicando uma alteração no estado normal do indivíduo (Van Gestel e Van Brummelen, 1996; der Oost *et al.*, 2003).

Efeitos ecotoxicológicos em peixes (*Salmo trutta fario*) expostos a concentrações ambientalmente realistas de omeprazol com recurso a biomarcadores de stress oxidativo e peroxidação lipídica

De modo a serem utilizados, os biomarcadores devem atender a determinados requisitos tais como: capacidade de responder de forma esperada, baixo custo, possíveis de serem aplicados sobre diversas condições de teste e elevada sensibilidade a um variado número de contaminantes ambientais (Nunes *et al.*, 2008).

Na avaliação da contaminação ambiental, o interesse em utilizar-se biomarcadores deve-se ao facto de estes possuírem duas características bastantes importantes, sendo estas a identificação de possíveis interações estabelecidas entre contaminantes e os organismos, e a determinação de efeitos sub-letais que possibilita colocar em prática ações preventivas e/ou remediadoras (Jesus e de Carvalho, 2008).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) criou uma classificação tradicional onde os biomarcadores são divididos em três classes (WHO International Programme on Chemical Safety (IPCS), 1993; der Oost *et al.*, 2003):

Biomarcadores de exposição: são definidos como substâncias exógenas ou metabolitos destas ou ainda, como produtos resultantes da interação de uma estrutura molecular endógena e um xenobiótico (National Research Council, 1987; Manno *et al.*, 2010), que permitem verificar a distribuição do xenobiótico ao longo do organismo, sendo por isso designados de dose interna (National Research Council, 1987). São, portanto, úteis para determinar se ocorreu exposição de um organismo a um determinado xenobiótico (Jesus e de Carvalho, 2008). São exemplos deste tipo de biomarcadores a vitelogenina (proteína que aumenta em resposta a produtos químicos tais como estrogénios) e as proteínas metalotioneína ou CYP1A que indicam elevadas concentrações de metais pesados biodisponíveis (Connon *et al.*, 2012).

Biomarcadores de efeito: pode ser considerado como um parâmetro biológico que reflete a interação de uma determinada substância química com os recetores biológicos existentes no organismo (Amorim, 2003), sendo estes indicativos do efeito deletério ou de alterações funcionais no organismo, fornecendo assim sinais que revelam um declínio da saúde do organismo ou perturbação ambiental (Connon *et al.*, 2012).

Um exemplo são as alterações bioquímicas, que ao se considerar que estas antecedem o dano estrutural, a sua identificação precoce evita uma exposição excessiva e irreversível, ou seja, a doença. Outro, são as enzimas tais como hépató-amino-ácidos transaminases

Efeitos ecotoxicológicos em peixes (*Salmo trutta fario*) expostos a concentrações ambientalmente realistas de omeprazol com recurso a biomarcadores de stress oxidativo e peroxidação lipídica

uma vez que são lançadas na corrente sanguínea após lesão nos tecidos (Jesus e de Carvalho, 2008).

Biomarcadores de suscetibilidade: A predisposição genética assim como fatores externos tais como sexo, jejum, tamanho, entre outros (Jesus e de Carvalho, 2008), podem influenciar a suscetibilidade que um organismo apresenta em relação a determinada substância (Amorim, 2003). Estes biomarcadores permitem avaliar a suscetibilidade e a resistência que um organismo apresenta em relação aos efeitos nocivos de um determinado xenobiótico (Sogorb *et al.*, 2014).

A principal razão para a utilização dos biomarcadores é que estes fornecerem informações sobre efeitos biológicos do contaminante e não apenas uma mera quantificação dos seus níveis ambientais (der Oost *et al.*, 2003). No entanto, embora esta classificação clássica seja simples (Manno *et al.*, 2010), a sua utilização pode não ser a mais correta uma vez que nem sempre é possível atribuir cada biomarcador uma única categoria (Manno *et al.*, 2010), podendo ocorrer sobreposição de algumas classificações (der Oost *et al.*, 2003). Devido à complexidade dos contaminantes ambientais e de estes induzirem uma variedade de respostas nos organismos a eles expostos, é necessário muitas das vezes a utilização de diferentes biomarcadores em conjunto e não apenas de um isolado a fim de se obterem resultados mais precisos (Zorita *et al.*, 2007).

Segundo Oost *et al.* (2003), os biomarcadores mais utilizados para avaliar a exposição ou os efeitos causados pelos contaminantes nos ecossistemas aquáticos são: enzimas de biotransformação, parâmetros de stress oxidativo, produtos de biotransformação, metalotioneínas, parâmetros hematológicos, imunológicos genotóxicos, reprodutivos endócrinos, parâmetros neuromusculares, fisiológicos, histológicos e morfológicos.

3.1 Biomarcadores de stress oxidativo

As espécies reativas de oxigénio são um conjunto de radicais livres nomeadamente, anião radical superóxido (O_2^-), radical hidroxilo (OH \cdot), alcóxido (RO \cdot) e o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) (der Oost *et al.*, 2003; Ray *et al.*, 2012; Costa *et al.*, 2016; Shehna Mahim *et al.*, 2021; Kumari *et al.*, 2022), que resultam do metabolismo de oxigénio, sendo por isso a mitocôndria, através da cadeia transportadora de eletrões, a principal

fonte de produção destas espécies (Barbosa *et al.*, 2010). Nesta, para que ocorra a produção de trifosfato de adenosina, é utilizado pelas enzimas oxidases, cerca de 90% de oxigénio, ocorrendo adicionalmente a redução de O_2 e água. Deste processo 1-4% do oxigénio (O_2) utilizado é convertido em O_2^- e H_2 , (Costa *et al.*, 2016).

Quando produzidas em baixas concentrações, as ERO desempenham importantes funções no organismo tais como regulação da expressão de genes, mecanismo de defesa contra bactérias, manutenção do ambiente homeostático, produção de energia, regulação do crescimento celular, fagocitose e sinalização celular (Ribeiro *et al.*, 2005; França *et al.*, 2013; Vasconcelos *et al.*, 2014; Kumari *et al.*, 2022), mas quando ocorre uma produção excessiva podem-se originar doenças agudas (Kumari *et al.*, 2022), uma vez que estas têm capacidade de interagir com macromoléculas celulares, tais como, ácidos nucleicos, proteínas e lípidos (Ray *et al.*, 2012), podendo resultar fenómenos tais como: danos no DNA, inativação enzimática, peroxidação lipídica e mesmo morte celular (der Oost *et al.*, 2003; Turrens, 2003). Para evitar tal acontecimento, os organismos são dotados de defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas que eliminam as quantidades excessivas de ERO (Li *et al.*, 2009).

Os sistemas de defesas antioxidantes que conduzem a uma inibição da formação de ERO incluem enzimas tais como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a glutationa-redutase (GRED), a glutationa peroxidase (GPX) e as glutationa-S-transferases (GSTs). O sistema de defesas antioxidante não enzimático envolve enzimas de baixo peso molecular tais como ácido ascórbico (Vitamina C), α -tocoferol (Vitamina E), β -caroteno (vitamina B), e ubiquinol 10 (der Oost *et al.*, 2003).

3.1.1 Catalase

Sendo uma das mais importantes enzimas antioxidantes, a CAT existe amplamente em quase todos os organismos aeróbicos (Goc *et al.*, 2021). É uma enzima citoplasmática pertencente à classe das enzimas oxidorreduzoras sendo constituída por um grupo heme (Gebicka e Krych-Madej, 2019; Shaer *et al.*, 2022). Localizada e armazenada nos peroxissomas das células (Siraki *et al.*, 2002), a principal função desta enzima é a defesa antioxidante primária da célula da qual resultam espécies atóxicas (Nunes *et al.*, 2020).

Efeitos ecotoxicológicos em peixes (*Salmo trutta fario*) expostos a concentrações ambientalmente realistas de omeprazol com recurso a biomarcadores de stress oxidativo e peroxidação lipídica

É conhecida pela sua capacidade de decompor o peróxido de hidrogénio (H₂O₂) em oxigénio(O₂) e água (H₂O) (Roguska *et al.*, 2021; Man *et al.*, 2022) (Figura 7) de modo a equilibrar a produção e acumulação deste no organismo (Nunes *et al.*, 2020), desempenhando assim, um papel fundamental na defesa dos organismos contra danos oxidativos causados por ERO (Shaeer *et al.*, 2022).

A via fisiológica ocorre durante o metabolismo basal ou do contacto com um poluente (Nunes *et al.*, 2020).

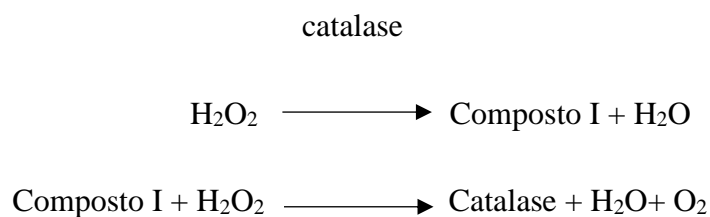


Figura 7. Decomposição do peróxido de hidrogénio (atividade catalítica) em dois processos. (Gebicka e Krych-Madej, 2019)

Para além da decomposição do H₂O₂, a enzima é também responsável pela oxidação de compostos hidrogenados como é o caso do metanol, etanol, ácido fórmico e fenóis, sendo portanto descrita como uma enzima catalítica com dupla função (Nunes *et al.*, 2020).

A CAT é utilizada como biomarcador no estudo do impacto ambiental, uma vez que a sua atividade quando o organismo se encontra em stress oxidativo sofre alterações, quer a nível do aumento (Cogo *et al.*, 2009) quer a nível de inibição (Guiloski *et al.*, 2017).

3.1.2 Glutathione-S-transferases

As glutathione-S-transferases (GSTs) são enzimas de metabolização de fase II (der Oost *et al.*, 2003), responsáveis pela desintoxicação e respetiva excreção de substâncias e de xenobióticos (Trute *et al.*, 2007), assim como pelo transporte intracelular, a síntese de leucotrienos e de prostaglandinas (der Oost *et al.*, 2003). Produzidas pelo fígado e encontradas na maioria dos tecidos humanos (Eren *et al.*, 2018), as GSTs são o principal

Efeitos ecotoxicológicos em peixes (*Salmo trutta fario*) expostos a concentrações ambientalmente realistas de omeprazol com recurso a biomarcadores de stress oxidativo e peroxidação lipídica

grupo de proteínas solúveis responsáveis pela conjugação de compostos eletrofílicos reativos com a glutatona reduzida (GSH) (Torres *et al.*, 2006; Bessa *et al.*, 2009). Esta conjugação deve-se ao facto de as GSTs serem responsáveis por diminuir o valor de pH de 9,5 para um valor neutro ao nível da cistina nucleofílica existente na estrutura da GSH, possibilitando a ligação tioéter no sítio eletrofílico da glutatona (GSH) com o xenobiótico ou substância endógena da qual resulta um composto quimicamente menos reativo e mais solúvel potenciando a sua eliminação do organismo através da excreção urinária (Schultz *et al.*, 1997; Eren *et al.*, 2018).

3.2 Biomarcadores de peroxidação lipídica: TBARS

A existência de mecanismos de defesa antioxidantes nas células pode ser superada por fatores oxidantes, provocando lesões tecidulares ao nível das membranas celulares, lesões nos ácidos nucleicos, desnaturação das enzimas de proteínas estruturais e desnaturação de componentes polissacarídeos que constituem das membranas basais (Vannucchi *et al.*, 1998).

A peroxidação lipídica (PL) é um processo no qual os radicais livres atacam os lípidos das membranas (Leon e Borges, 2020), dando origem a um desequilíbrio entre os compostos oxidantes e defesas antioxidante, a favor dos compostos oxidantes (Cristóvão *et al.*, 2013; Goc *et al.*, 2021).

Este processo pode ocorrer por via enzimática, envolvendo cicloxigenases e lipoxigenases, ou por via não enzimática. Pela via não enzimática, a PL é descrita como um processo desencadeado pela superprodução de radicais livres, como as ERO e as espécies reativas de nitrogénio (ERN), do qual resulta o ataque as ligações duplas carbono-carbono existentes nos lípidos insaturados das membranas celulares (Lima e Abdalla, 2001; Leon e Borges, 2020).

Deste processo resultam algumas consequências tais como a alteração da fluidez das membranas e possível rutura (Caldioli *et al.*, 2020), colocando em causa o fluxo de iões e de outras substâncias (Lima e Abdalla, 2001), perda de seletividade para a entrada/saída de nutrientes e substâncias tóxicas na célula, alterações no DNA e comprometimento de

Efeitos ecotoxicológicos em peixes (*Salmo trutta fario*) expostos a concentrações ambientalmente realistas de omeprazol com recurso a biomarcadores de stress oxidativo e peroxidação lipídica

componentes da matriz extracelular, tais como proteoglicanos, colagénio e elastina (Lima e Abdalla, 2001).

O processo de PL é composto por três etapas: iniciação, propagação e terminação (Lima e Abdalla, 2001; Hashemi, 2019) (Figura 8), sendo sempre iniciado por um oxigénio na sua forma ativa, ou seja, na sua forma reduzida como é o caso dos radicais H_2O_2 , O_2^- e $HO\cdot$ (Lima e Abdalla, 2001).

A primeira etapa, em que é iniciado o processo de PL, envolve o ataque de ácido gordo polinsaturado constituinte da membrana celular sofre ataque por uma espécie suficientemente reativa, removendo-lhe um átomo de hidrogénio a partir de um grupo metileno ($-CH_2-$), resultando deste ataque um radical de carbono, o radical alquilo ($RO\cdot$). O radical alquilo formado, em condições aeróbicas, é combinado com o oxigénio dando origem a um radical peroxilo ($ROO\cdot$).

Os radicais peroxilo para além de se combinarem entre si, podem também remover um átomo de hidrogénio num outro ácido gordo polinsaturado dando origem a outro radical, o radical hidroperóxido ($ROOH$). Este segundo ataque promove assim a segunda etapa do processo, a propagação.

Nesta fase, o $ROOH$ pode reagir com alguns metais de transição nomeadamente Ferro (Fe^{n+}) e Cobre (Cu^{n+}) sendo que destas interações resultam radicais lipídicos alcóxilo ($RO\cdot$), peroxilo ($ROO\cdot$) e hidroxilo ($OH\cdot$).

Na fase de terminação ocorre a aniquilação dos radicais formados nas etapas anteriores sendo assim neutralizados. Os radicais peroxilo e alcóxilo também podem sofrer dismutação ou clivagem dando origem a aldeídos, sendo estes bastantes reativos contribuindo para os danos causados pelos radicais livres (Lima e Abdalla, 2001).

Efeitos ecotoxicológicos em peixes (*Salmo trutta fario*) expostos a concentrações ambientalmente realistas de omeprazol com recurso a biomarcadores de stress oxidativo e peroxidação lipídica

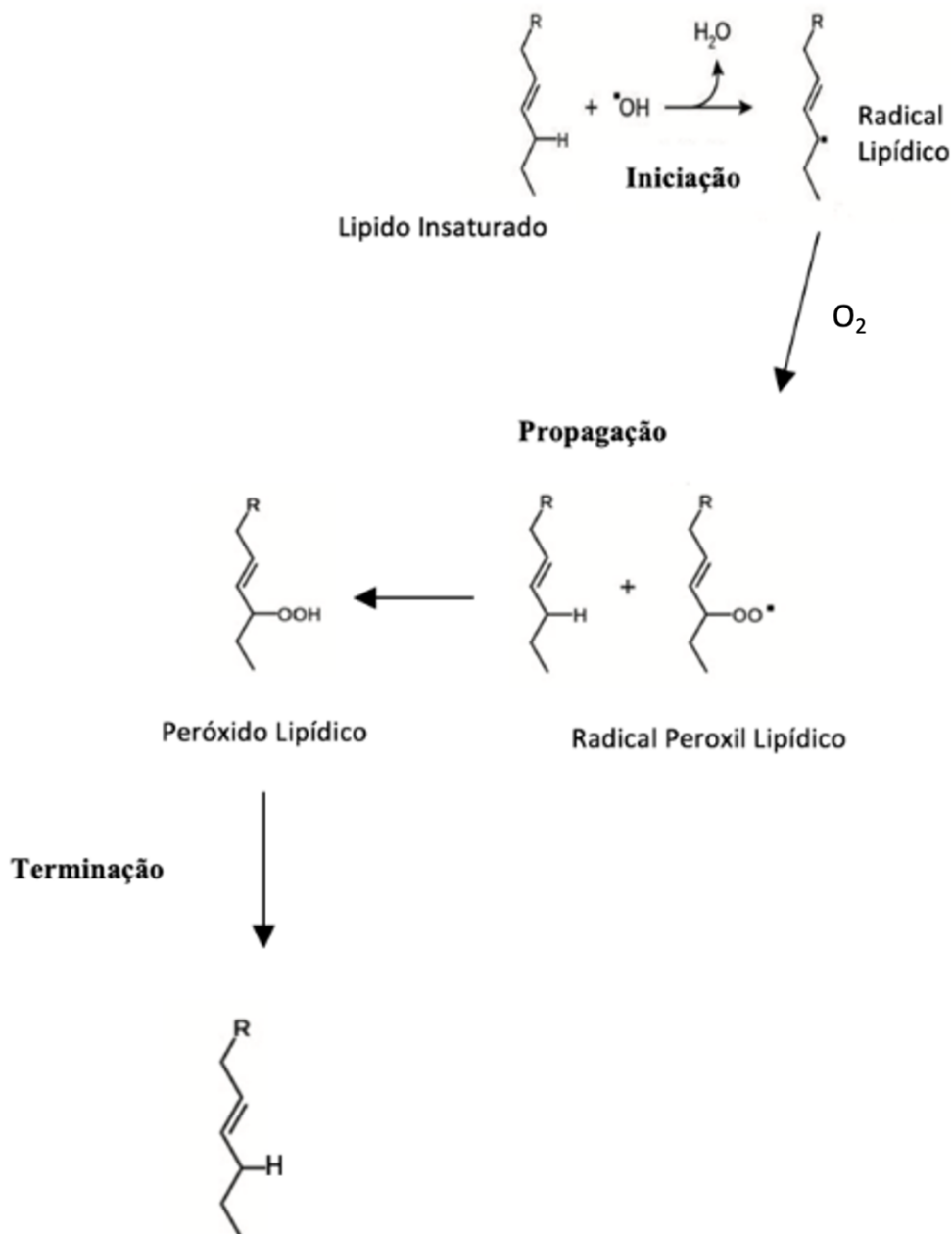


Figura 8. Etapas envolvidas no processo de peroxidação lipídica (Hashemi, 2019).

O malondialdeído (MDA) é um dos principais produtos secundários resultante da peroxidação lipídica (França *et al.*, 2013), que para além de reagir com bases de ácidos nucleicos (Del Rio *et al.*, 2005) da qual resultam produtos fluorescentes (Uchida, 1999), reage diretamente com o ácido tiobarbitúrico (TBA) (Figura 9), sendo por isso o método TBARS um método rápido que permite evidenciar a peroxidação lipídica (Shlafer e Shepard, 1984),

Efeitos ecotoxicológicos em peixes (*Salmo trutta fario*) expostos a concentrações ambientalmente realistas de omeprazol com recurso a biomarcadores de stress oxidativo e peroxidação lipídica

Da reação entre estas duas substâncias resultam produtos que podem ser determinados por absorção no visível ($\lambda = 532 \text{ nm}$) ou por fluorescência (Lima e Abdalla, 2001; França *et al.*, 2013) (Figura 9).

Apesar de ser um método simples e de fácil execução, não é específico para o MDA, uma vez que o TBA pode reagir com outros compostos, tais como açúcares, aminas, aminoácidos, proteínas e bilirrubina, sendo por isso apelidado de teste das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico. Contudo, a facilidade no processo de execução assim como o seu baixo custo comparativamente com outros métodos, faz com que este seja amplamente aplicado (França *et al.*, 2013).

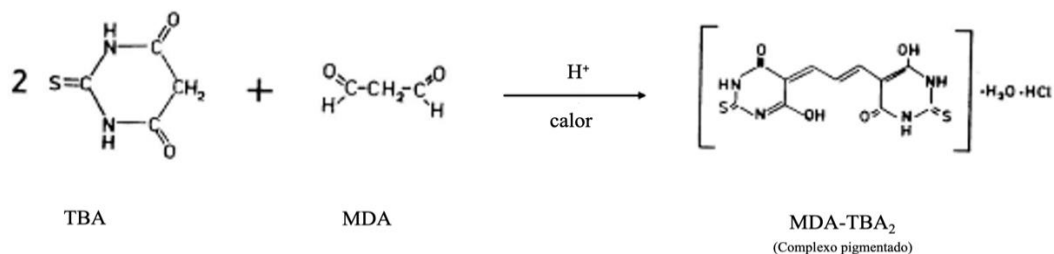


Figura 9. Reação entre o ácido tiobarbitúrico (TBA) e o malonildialdeído (MDA) (Guillén-Sans e Guzmán-Chozas, 1998).

4. Peixes: A sua importância enquanto organismos-teste em bioensaios

A maioria dos compostos que chegam ao meio aquático, interagem com a biota incorporando-se nos tecidos dos organismos provocando-lhes efeitos tóxicos (Jacob *et al.*, 2020). Caso sejam biologicamente ativos e não sejam totalmente degradados, a sua presença torna-se preocupante devido aos efeitos aditivos ou sinérgicos com outros poluentes ambientais (Regitano e Leal, 2010; Nunes *et al.*, 2015a). Os efeitos da contaminação podem ser reconhecidos como letais ou sub-letais. A nível dos efeitos letais, ocorre uma interferência nos processos celulares do organismo de forma intensa, podendo originar rapidamente o óbito dos indivíduos, enquanto os efeitos subletais afetam os processos fisiológicos e comportamentais dos organismos, mas não causam mortalidade imediata (Ribeiro e Américo-Pinheiro, 2018).

Para a realização de estudos de toxicidade, a escolha do organismo-teste deverá ser realizada de acordo com o objetivo do estudo, tendo em atenção às principais características do ambiente assim como as do próprio organismo (Ribeiro e Américo-Pinheiro, 2018).

Os peixes são considerados bons indicadores relativamente à qualidade do meio aquático e à presença de xenobióticos, por vários motivos, nomeadamente pelas semelhanças em muitos processos fisiológicos em comparação com mamíferos (Corcoran *et al.*, 2010), pela grande diversidade ecológica (diferentes estilos de vida e habitats) e pelas diversas posições que ocupam na cadeia alimentar, sendo estes os principais consumidores na cadeia alimentar dos ecossistemas aquáticos (Mastrángelo e Ferrari, 2013) indicando respostas de efeitos crônicos, acumulativos e persistentes ao nível da cadeia alimentar. Nesta, os peixes são a classe de vertebrados mais vulnerável quando o agente tóxico atinge o topo da cadeia por biomagnificação (Ribeiro e Américo-Pinheiro, 2018).

Apesar de existirem algumas desvantagens no uso dos peixes tais como, elevada mobilidade, estes organismos são ainda assim considerados viáveis para a monitorização da poluição em sistemas aquáticos (der Oost *et al.*, 2003). Das principais razões destaca-se o facto de estes serem bastante suscetíveis à contaminação por fármacos, uma vez que a maioria dos produtos são apolares e por isso são capazes de atravessar as membranas biológicas por difusão, acumulando-se no interior das células e em tecidos específicos (Corcoran *et al.*, 2010). A absorção dos agentes contaminantes ocorre tanto pela superfície dérmica como pelas brânquias ou por via oral através da alimentação. Outra via de absorção é a via materna que permite a transferência de contaminantes através da reserva lipídica dos ovos (Corcoran *et al.*, 2010).

As mudanças na taxa de crescimento e na maturação sexual são exemplos de resposta à poluição à qual os peixes estão expostos (Ribeiro e Américo-Pinheiro, 2018; Rodrigues *et al.*, 2020), que podem resultar do stress oxidativo e alterações do DNA (der Oost *et al.*, 2003).

4.1 *Salmo trutta fario*

No presente trabalho experimental foi utilizado como organismo teste *Salmo trutta fario* por diversas razões. A primeira e principal razão é o facto de esta ser uma espécie comum no que diz respeito à avaliação ecotoxicológica de variadas substâncias quer de origem orgânica ou inorgânica (Nunes *et al.*, 2015b). O facto de esta espécie se adaptar facilmente às condições laboratoriais, nomeadamente durante a quarentena e procedimentos de exposição, contribui de igual forma para a sua escolha e para a conclusão de todos os processos experimentais com sucesso. Além disso, o seu tamanho corporal permite a obtenção de quantidades satisfatórias de amostras de tecidos utilizados em ensaios biológicos (Nunes *et al.*, 2015a), o que contribui de igual forma para a seleção desta espécie.

Salmo Trutta é uma espécie de peixe que pertence à família Salmonidae, podendo ser subdividido em *Salmo trutta morpha trutta* ou *Salmo trutta morpha fario* (StringFixer, 2022).

Salmo trutta morpha fario é um peixe de água doce, não migrante (BioDiversity4all, 2022) sendo o seu *habitat* preferido riachos profundos com águas correntes, frias e oxigenadas (Geraldes, 1999) embora possam ser encontrados em lagos (Animal Diversity Web, 2022).

É uma espécie indígena da Europa, sendo que em Portugal encontra-se em rios do norte e centro do país, e mais a sul no troço superior do rio Zêzere e no Rio Sever (Gonçalves *et al.*, 2006). A sua alimentação baseia-se em lavas aquáticas, peixes pequenos e insetos que caem na água, e a sua longevidade máxima é de 6 a 7 anos (Geraldes, 1999).

É uma espécie de peixe com alto valor socioeconómico (Marić *et al.*, 2012) devido ao seu interesse para a pesca desportiva, contribuindo assim para que a sua produção seja essencialmente direccionada para o repovoamento de cursos de água de salmonídeos (Gonçalves *et al.*, 2006).

5. Objetivo

Este trabalho experimental teve como objetivo determinar, recorrendo a biomarcadores de defesa anti-oxidante (Catalase e Glutathione-S-transferases) e de peroxidação lipídica (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico), possíveis efeitos toxicológicos em brânquias e fígado de *Salmo trutta fario*, decorrentes de uma exposição crónica (28 dias) a uma concentração ambientalmente realista de omeprazol.

6. Material e métodos

6.1 Aquisição e acondicionamento dos peixes

Cerca de 72 exemplares juvenis de *Salmo trutta fario* foram adquiridos no Posto Aquícola Torno-Marão, no norte de Portugal, tendo sido transportados até ao laboratório em sacos plásticos com água doce refrigerada e com aerificação constante. Aquando da sua chegada, os organismos foram colocados num tanque de 500 litros com água doce previamente desclorada, filtração biológica e com fotoperíodo constante (12h L: 12hD), a fim de cumprirem um período de quarentena de 14 dias.

Durante este período foi verificada a qualidade da água, nomeadamente a temperatura, pH e oxigénio dissolvido com recurso a uma sonda multiparamétrica (YSI, 556 MPS). Monitorizou-se também as concentrações de nitritos (NO₂) e amónia (NH₃) através de uma reação colorimétrica (com pastilhas da Palintest) e leitura num fotómetro (YSI, 9300 Photometer). Os indivíduos foram alimentados diariamente com ração artificial (Sorgal, Portugal) até à saciedade. Durante este período a mortalidade foi inferior a 10% no grupo controlo estando em conformidade com as regras de experimentação animal (OCDE, 1998).

6.2 Exposição ao omeprazol

Cumprido o período de quarentena, foram selecionados, aleatoriamente, 60 indivíduos saudáveis com tamanho semelhante (aproximadamente 10 cm) sendo estes distribuídos em quatro grupos de tratamento (controlo negativo, baixa concentração, média

Efeitos ecotoxicológicos em peixes (*Salmo trutta fario*) expostos a concentrações ambientalmente realistas de omeprazol com recurso a biomarcadores de stress oxidativo e peroxidação lipídica

concentração e alta concentração). Estes quatro grupos foram ainda subdivididos em três réplicas perfazendo um total de 12 aquários cada um com 50 L de água e com 5 indivíduos.

Os indivíduos foram expostos cronicamente a concentrações subletais crescentes do omeprazol (0,01 µg/l, 0,1 µg/L e 1,0 µg/L), incluindo um controlo negativo (0 µg/L).

Foram escolhidas as concentrações de omeprazol acima referidas tendo em conta o trabalho de Van Nuijs *et al.* (2010), onde foi reportado a existência de omeprazol até 0,05 µg/L em águas residuais afluentes de estações de tratamento de águas na Bélgica, assim como em águas superficiais do rio Lambro (DellaGreca *et al.*, 2006; van Nuijs *et al.*, 2010).

O período de exposição durou 28 dias de acordo com as diretrizes da OCDE (1998), sendo igualmente controlados os parâmetros físico-químicos tais como, pH (9,20), temperatura (12,4 °C), oxigénio dissolvido 11,24 mg/L), nitritos (0,04 mg/L) e amónia (0.79 mg/L). A alimentação artificial dos organismos continuou a ser diariamente com o mesmo alimento, sendo também a água parcialmente renovada (em 80%) a cada 48 horas.

Todos os aquários foram cobertos com uma rede sombra e mantidos num compartimento com total obscuridade devido a evitar a fotodegradação do omeprazol (DellaGreca *et al.*, 2006), a fim de garantir as concentrações do mesmo ao longo de toda a exposição.

6.3 Recolha e preparação dos tecidos/órgãos

Após 28 dias de exposição, os peixes saudáveis foram sacrificados através de um método descrito por (Wilson *et al.*, 2009). Para tal, recorreu-se a um rápido arrefecimento dos indivíduos mergulhando-os num recipiente com quantidades iguais de água e gelo (inferiores a 4°C) até a cessação dos movimentos operculares e natação.

Posteriormente, os peixes foram dissecados em tampão fosfato, em gelo, sendo-lhes retirado o fígado e as brânquias. Os órgãos recolhidos foram colocados em tubos de *ependor*, mergulhados em azoto líquido (-196°C) e armazenados em arca congeladora a uma temperatura de -80°C para posterior análise.

Efeitos ecotoxicológicos em peixes (*Salmo trutta fario*) expostos a concentrações ambientalmente realistas de omeprazol com recurso a biomarcadores de stress oxidativo e peroxidação lipídica

Todos os experimentos realizados tiveram em conta a lei portuguesa de bem-estar animal (Decreto-lei 113/2013), tendo sido previamente autorizados pelo comissão de ética da instituição de acolhimento (ICBAS-UP) (Diario da Republica, 2013).

6.4 Ensaio enzimáticos

A fim de se realizarem os ensaios pretendidos, preparou-se em ambiente refrigerado (4°C) um homogeneizado com cada um dos órgãos (fígado e brânquias), isolando-se para tal porções equiparáveis em microtubos de Eppendorf (2 mL) aos quais foi adicionado posteriormente 400 µL de tampão fosfato, utilizando-se para o efeito um sonicador (Branson Sonifier 250).

Concluído o processo de homogeneização, foi realizada uma centrifugação a 1500 g (centrifuga Eppendorf 5810R) durante 10 minutos a 4°C. Desta centrifugação resultou o sobrenadante e o *pellet*. O sobrenadante foi recolhido para um novo tubo de Eppendorf e colocado a -80°C a fim de conservar a amostra para realização de ensaios bioquímicos posteriores. O *pellet* foi rejeitado.

6.4.1 Determinação da atividade da enzima CAT

A determinação da atividade da enzima CAT teve em conta o método descrito por Aebi (1984). Devido à capacidade fisiológica que esta enzima apresenta em decompor o peróxido de hidrogénio (H₂O₂) em oxigénio molecular (O₂) e água (H₂O), a sua atividade pode ser determinada de acordo com o consumo de peróxido de hidrogénio, sendo este possível de medir por espectrofotometria a um $\lambda = 240$ nm de 20 em 20 segundos durante 5 minutos num espectrofotómetro UV/VIS (Biotek Synergy HT).

Esta determinação foi realizada no fígado e nas brânquias com uma diluição necessária em ambos os tecidos originais, nomeadamente 1:1000 e 1:50 respetivamente. A atividade desta enzima foi expressa em $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína.

6.4.2 Determinação da atividade das enzimas GSTs

Habig *et al.* (1974) descreveram um protocolo que permite a determinação da atividade enzimática das GSTs por um meio de espectrofotometria, que permitiu a realização da quantificação da atividade enzimática quer no tecido hepático quer no tecido branquial do organismo teste (*Salmo trutta fario*). Para tal, recorreu-se a uma diluição de 1:100 no fígado e de 1:10 nas brânquias com tampão fosfato (50 mM, pH 7,0, com Triton X-100 0,1%) (Habig *et al.*, 1974).

Num modo geral, as isoenzimas Glutathione-S-Transferases (GSTs) são responsáveis pela conjugação de compostos constituídos por centros eletrofílicos, tais como o composto 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CBDN) com a glutathione na sua forma reduzida (GSH). Desta conjugação resulta um tioéter, podendo a sua formação ser acompanhada espectrofotometricamente a um $\lambda=340$ nm por aumento da absorvância.

A nível laboratorial o aumento da absorvância foi medido no λ referido, sendo registada a cada 20 segundos durante um período de 5 minutos e a atividade da enzima foi expressa em $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína.

6.4.3 Determinação da peroxidação lipídica (TBARS – Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico)

A fim de se determinar a extensão da PL, recorreu-se ao método do MDA descrito por Buege e Aust (1978) por este ser um dos principais produtos resultantes da peroxidação lipídica, indicado stress oxidativo. O princípio do método consiste na reação entre o MDA (formado pelo ataque das ERO) e um reagente cromogénico, o ácido tiobarbitúrico (TBA), da qual resulta um produto cromóforo de cor rosa-fluorescente. A concentração deste composto é possível de ser determinada por leitura espectrofotométrica (Buege e Aust, 1978).

A leitura das amostras foi executada recorrendo a um leitor de microplacas de 96 poços (Biotek Synergy HT), tendo posteriormente sido os resultados expressos em mmol de MDA por mg de proteína.

6.4.4 Quantificação da proteína solúvel total

Com o intuito de normalizar a forma como as atividades enzimáticas e os níveis de peroxidação lipídica se expressam a atividade de cada enzima foi calculada em função da proteína total existente em cada organismo. A quantificação da proteína solúvel total foi realizada para cada uma das enzimas assim como nas TBARS, de forma isolada e simultânea, utilizando para tal os homogeneizados de fígado e brânquias.

Este procedimento seguiu um método descrito por Bradford (Bradford, 1976), que se baseia numa reação, em meio ácido, entre as proteínas existentes e o corante azul brilhante de Coomassie G-250 existente no reagente de Bradford.

Após 15 minutos de agitação, a ligação das proteínas existentes no meio ao corante leva à formação de um complexo de cor azul, sendo este estável, podendo a sua absorvância ser medida espectrofotometricamente a um $\lambda = 595$ nm.

Pela elaboração de uma curva de calibração com concentrações conhecidas e crescentes de uma solução de γ - globulina bovina (0,25 mg/L; 0,50 mg/L; 0,75 mg/L; 1,00 mg/L) é possível relacionar a absorvância obtida com o valor da concentração de proteína real permitindo assim a conversão dos valores de absorvâncias das amostras em valores de concentração proteica.

Posteriormente, procedeu-se à leitura num espectrofotómetro de microplacas de 96 poços (Biotek Synergy HT) a um $\lambda = 595$ e a temperatura ambiente.

De salientar que as determinações enzimáticas, as TBARS e a quantificação da proteína solúvel total, foram realizadas em quadruplicado analítico.

6.4.5 Análise Estatística

Os dados obtidos foram previamente testados quanto à normalidade (teste de Shapiro-Wilk) e à homogeneidade de variância (teste de Levene).

Após verificação de tais pressupostos, procedeu-se a uma análise de variância unifatorial (One-Way Anova) para testar eventuais diferenças entre os grupos de tratamento. Na ocorrência de diferenças significativas ($P < 0,05$), realizou-se um teste de Dunnett a fim de comprovar diferenças estatisticamente significativas. O presente estudo não evidenciou diferenças estatisticamente significativas entre as réplicas (One-Way Anova $P > 0,05$). Para a realização desta análise foi utilizado um software (SigmaPlot[®] 11.0) sendo os valores obtidos apresentados como média \pm erro padrão e com um nível de significância de 95%.

7. Resultados

7.1 Catalase

Os resultados obtidos na atividade da CAT (Figura 10) a nível do tecido hepático permitem avaliar um ligeiro aumento da sua atividade no grupo experimental de baixa concentração e no grupo experimental de alta concentração em relação ao grupo controlo, no entanto nenhum dos grupos experimentais apresenta diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo controlo (análise de variância unifatorial: $F_{[3,56]}=1,164$; $P=0,332$). A nível do tecido branquial ocorreu uma ligeira tendência diminutiva a nível da atividade desta enzima nos grupos expostos ao composto, no entanto não existem diferenças estatisticamente significativas (análise de variância unifatorial: $F_{[3,56]}=0,705$; $P=0,553$).

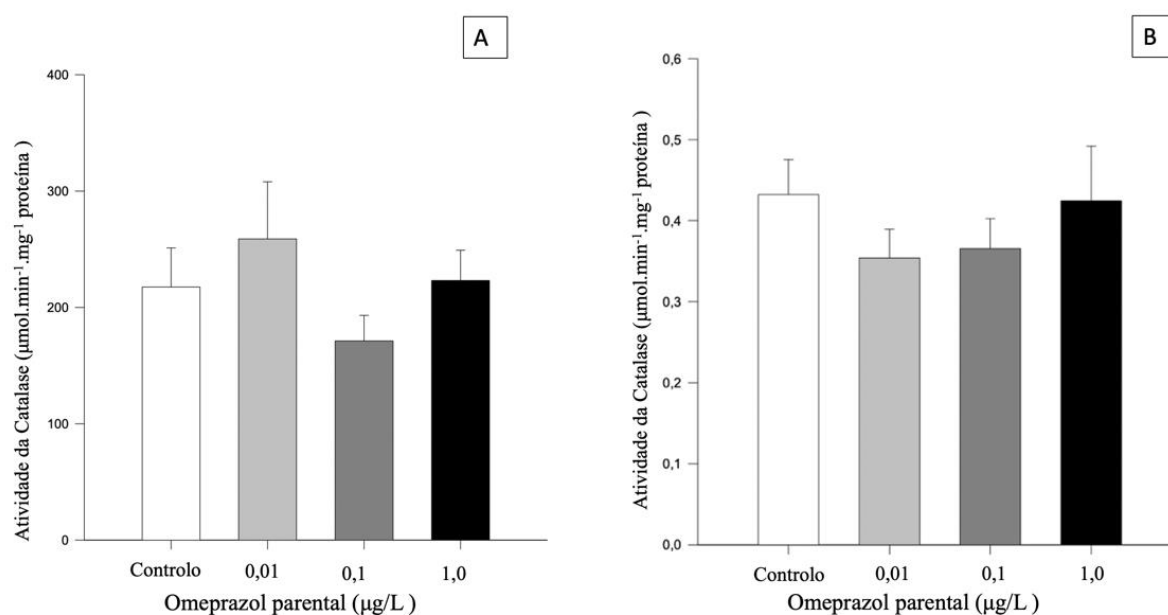


Figura 10. Resultados da atividade enzimática da catalase no fígado (A) e nas brânquias (B). Os resultados são apresentados como valores médios referentes a cada tratamento \pm erro padrão. Não foram evidenciadas alterações significativamente estatísticas entre os tratamentos (análise de variância unifatorial; $P > 0,05$).

7.2 GSTs

A figura 11 representa os resultados obtidos em relação à atividade das GSTs no fígado e nas brânquias.

O tecido hepático não demonstrou diferenças estatisticamente significativas entre tratamentos (análise de variância unifatorial: $F_{[3,56]}=0,767$; $P=0,517$). O mesmo é evidenciado no tecido branquial que, apesar de se verificar um ligeiro aumento da atividade no grupo de média e alta concentrações a nível das brânquias, após tratamento estatístico não são evidenciadas diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes grupos experimentais (análise de variância unifatorial: $F_{[3,56]}=0,641$; $P=0,592$).

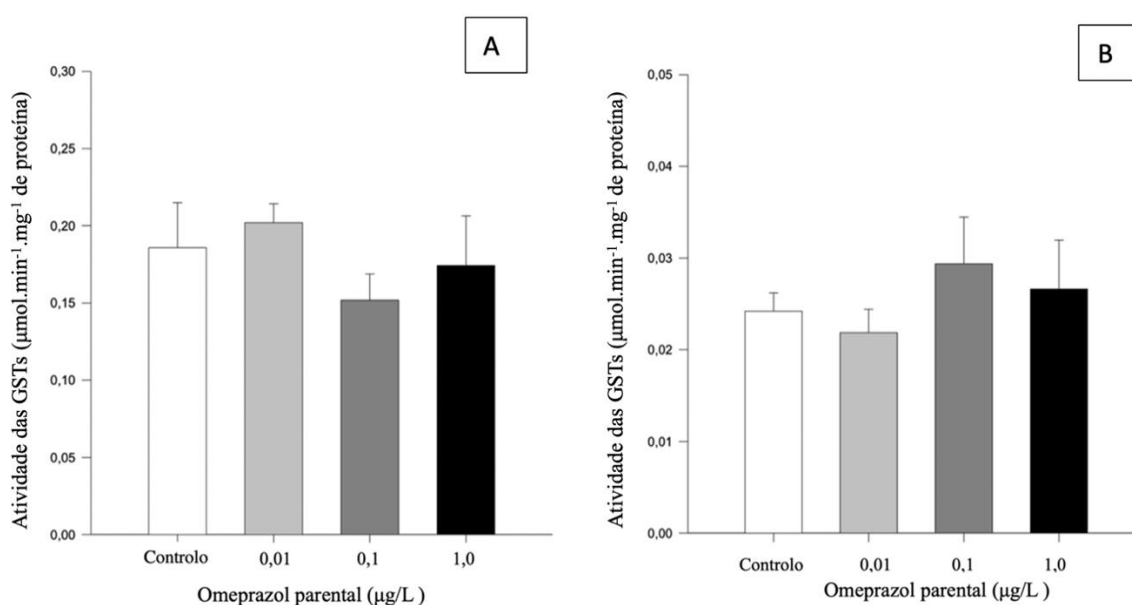


Figura 11. Resultados referentes à atividade das enzimas GSTs no fígado (A) e nas brânquias (B) em indivíduos de *Salmo trutta fario* após exposição crónica (28 dias) a diferentes concentrações de omeprazol. Os resultados são apresentados como valores médios referentes a cada tratamento \pm erro padrão. Não foram comprovadas alterações significativamente estatísticas entre os grupos estudados (análise de variância unifatorial: $P > 0,05$)

7.3 TBARS

Os valores obtidos relativos à peroxidação lipídica não demonstraram diferenças significativas entre tratamentos a nível do tecido hepático entre tratamentos (análise de variância unifatorial: $F_{[3,56]}=0,826$; $P=0,485$) (Figura 12).

No tecido branquial observou-se uma ligeira diminuição em todos os grupos expostos ao omeprazol, mas não estatisticamente significativa (análise de variância unifatorial: $F_{[3,56]}=2,733$; $P=0,052$).

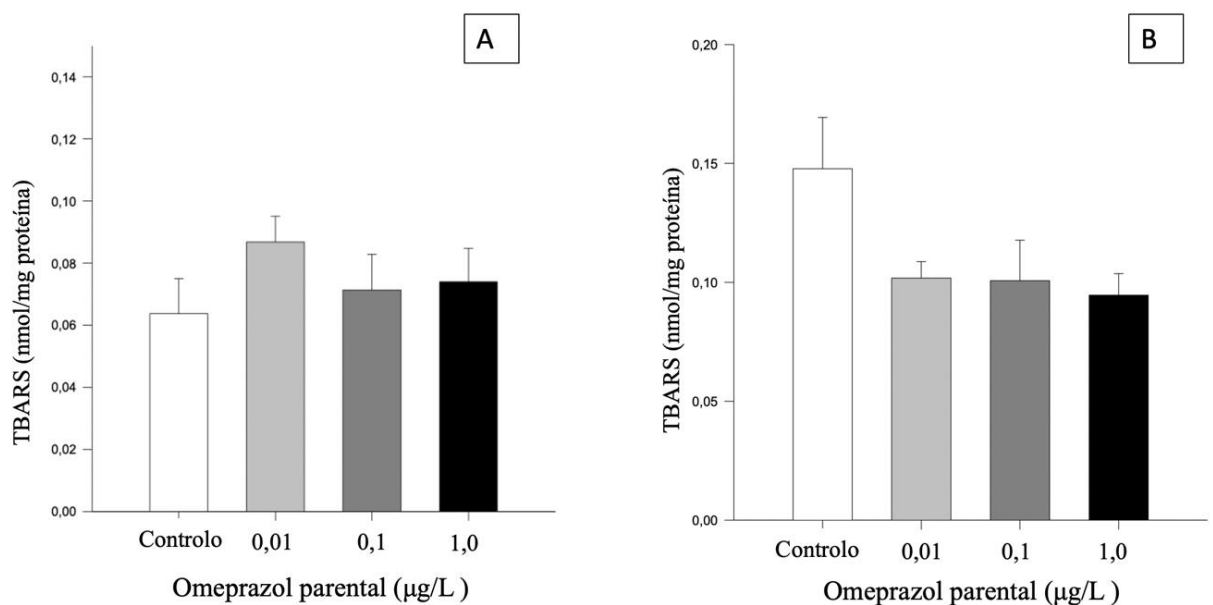


Figura 12. Valores referentes ao método TBARS no fígado (A) e nas brânquias (B). Os valores são apresentados como valores médios referentes a cada tratamento \pm erro padrão. Não foram comprovadas alterações significativamente estatísticas entre os diferentes tratamentos (análise de variância unifatorial: $P > 0,05$)

II. DISCUSSÃO

A exposição de um organismo a um determinado poluente resulta, primeiramente, na sua acumulação ao nível de determinados órgãos e tecidos, e em alterações moleculares precoces podendo provocar-lhes consequências adversas (De Oliveira e De Souza, 2006). Nesse sentido é usual recorrermos a biomarcadores que permitem determinar o efeito desse poluente no organismo (Shehna Mahim *et al.*, 2021), a vários níveis, nomeadamente a nível bioquímico, fisiológico e histológico, decorrentes da exposição ao xenobiótico (Jesus e de Carvalho, 2008).

Neste trabalho experimental, a escolha de organismo-teste teve em conta o facto de os peixes serem a classe de vertebrados mais abundante no meio aquático (Geraldês, 1999), estando estes frequentemente expostos a estressores ambientais, induzindo nos mesmo uma série de alterações tais como fisiológicas e bioquímicas (Madureira *et al.*, 2010). O fígado e as brânquias são órgãos chave neste estudo dado que respondem com facilidade a uma exposição a um dado xenobiótico (Bernet *et al.*, 1999; Correia *et al.*, 2020). Devido às suas características estruturais e fisiológicas especiais, as brânquias são altamente vulneráveis a agentes tóxicos sendo estas um órgão multifuncional que desempenha funções tais como respiração, regulação ácido-base, osmorregulação e excreção ((Li *et al.*, 2009; Correia *et al.*, 2020), e o fígado, é o principal órgão de metabolização responsável, entre outras funções, pela desintoxicação e excreção de xenobióticos (Moon *et al.*, 1985).

Os IBP são de uma das classes de fármacos mais prescritas em todo o mundo, havendo por isso um aumento no número de publicações acerca do seu uso na medicina humana e veterinária (Luo *et al.*, 2018). O omeprazol é descrito como um dos principais fármacos com potencial efeito deletério para os organismos aquáticos (Filho *et al.*, 2007), sendo considerado um poluente emergente antropogénico. Um trabalho recente demonstrou que este fármaco pode causar efeitos toxicogénicos nas células endoteliais do pulmão de *Mytilus galloprovincialis* (Paz *et al.*, 2020).

1. Catalase

A enzima catalase é considerada um sistema de defesa celular (Kim *et al.*, 2010), devido à sua capacidade de degradar o H_2O_2 , mantendo assim as suas concentrações intracelulares em condições fisiológicas (1-10 nanómetros) (Gebicka e Krych-Madej, 2019).

É uma das enzimas que mais responde às ERO (Oliveira *et al.*, 2010), contribuindo deste modo para o equilíbrio pró-oxidante/antioxidante fundamental à homeostasia celular (Vlahogianni *et al.*, 2007). Assim, em situações em que ocorre uma excessiva produção de H_2O_2 , é expectável um aumento da atividade da enzima de modo a que sejam evitados danos oxidativos nos organismos expostos (Hite *et al.* 1999; Li *et al.*, 2009), sendo por isso utilizada como um dos principais biomarcadores de stress oxidativo (Costa, 2018).

Este trabalho experimental não evidenciou alterações estatisticamente significativas ao nível da atividade da enzima catalase em ambos os órgãos em estudo para as concentrações e tempo de exposição testados. No entanto, o facto de existirem poucos estudos acerca das consequências a nível enzimático relativamente a uma exposição crónica ao omeprazol, não nos permite cabalmente inferir sobre o comportamento dos mecanismos de defesa face a este fármaco.

Contudo, existem estudos que revelam alterações na atividade desta enzima na presença de xenobióticos, inclusive fármacos e seus derivados, tal como a exposição de *Oncorhynchus mykiss* a carbamazepina (0,2 e 2,0 $\mu\text{g/L}$), que após 21 dias de exposição, originou uma inibição da atividade desta enzima no tecido brânquial, devido ao fluxo do radical superóxido, que proporciona um aumento de H_2O_2 nas células (Li *et al.*, 2009). O mesmo é descrito por Guiloski *et al.* (2017) em que uma exposição a diclofenac induziu uma diminuição na atividade da enzima a nível do fígado de *Rhamdia quelen*. É ainda referido por Nunes *et al.* (2020) que a exposição de *Hediste diversicolor* ao mesmo composto, não induziu alterações na atividade da enzima. No entanto é reportada uma diminuição significativa dependente da dose quando os peixes são alimentados com vermes que foram previamente expostos a diclofenac concluindo assim que, a exposição direta ou indireta ao xenobiótico pode induzir diferentes mudanças fisiológicas significativas nos organismos aquático.

Todas as razões que sustentam alterações da atividade da enzima CAT remetem para a produção excessiva das ERO. Na presença de um excesso de radical superóxido, este não é convertido pela enzima Superóxido Dismutase (SOD) (enzima que catalisa a dismutação de radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em oxigénio molecular (O_2) e peróxido de hidrogénio (H_2O_2) (Siddique *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2018)), e portanto, não ocorre a formação de H_2O_2 ficando a enzima CAT sem substrato para consumir. A atividade da enzima fica assim diminuída (Chandran *et al.*, 2005; Damásio *et al.*, 2007). Por outro lado, o aumento do fluxo de ERO contribui para um ataque direto às proteínas, oxidando-as. Desta oxidação resultam proteínas carboniladas onde a sua estrutura conformacional e a sua atividade catalítica estão alteradas, aumentando a suscetibilidade de serem destruídas por proteases (Stadtman, 2002; Zhang *et al.*, 2008). Sendo a catalase uma proteína (Fireman e Fireman, 1998), a sua modificação oxidativa leva à degradação proteolítica, da qual resulta uma diminuição ou inibição da sua atividade enzimática (Zhang *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2009).

Outro trabalho relata o aumento significativo da atividade da enzima, após exposição de *Oreochromis mossambicus*, durante 24 horas ao paracetamol (500 mg/kg), evidenciando assim uma tentativa de eliminação das EROs por parte do organismo (Kavitha *et al.*, 2011). No entanto, um estudo recente demonstra que tanto a nível de exposições agudas (96h) como crónica (28dias) de *Phallaceros harpagos* ao paracetamol com 5 concentrações diferentes (8, 80, 800, 8000 e 80000 $\mu\text{g/L}^{-1}$), a atividade da CAT não sofreu alterações estatisticamente significativas sendo este facto justificado pela atividade suficiente de outras enzimas, nomeadamente GSTs na conjugação e respetiva eliminação de NAPQI formado (Pereira, 2018).

Considerando a ausência da atividade da CAT no presente estudo, é possível sugerir que esta enzima não foi ativada, sendo neste caso expectável que outras enzimas pertencentes ao sistema antioxidante, tais como a SOD, tenham sido suficientes na eliminação deste composto. Outra possível abordagem é o caso da glutationa na sua forma reduzida (que mesmo não tendo sido abordada neste estudo, a sua determinação é importante), uma vez que ao ser oxidada dá origem a um dímero (GSSG) que conseqüentemente, consegue neutralizar as espécies reativas eletrofilicas (Fang *et al.*, 2002) evitando a alteração do funcionamento de outras enzimas tais como a CAT.

2. GSTs

As glutationas-s-transferases são isoenzimas com várias funções sendo a principal a destoxificação de diversos compostos, contribuindo assim para a prevenção de danos oxidativos ao nível dos tecidos (Srivastava *et al.*, 1999; Tuerlinckx *et al.*, 2018; Nunes *et al.*, 2020). Este processo é conseguido pela conjugação da GSH, através do seu grupo sulfidrílico (Torres *et al.*, 2004), com compostos constituídos por centros eletrofílicos, resultantes do metabolismo celular, da metabolização de xenobióticos e/ou produtos resultantes da peroxidação lipídica (Correia *et al.*, 2020). Desta conjugação resultam produtos menos tóxicos e mais solúveis em água, o que facilita a sua excreção contribuindo assim para a manutenção do metabolismo fisiológico (Torres *et al.*, 2004; Jena *et al.*, 2021).

Neste trabalho experimental, e a semelhança da CAT, não foram evidenciadas diferenças estatisticamente significativas em relação à atividade das GSTs em ambos os órgãos após exposição dos indivíduos ao omeprazol.

Em relação ao composto em análise, num estudo realizado por Costa (2018) foi demonstrado que o omeprazol sulfito numa concentração de 0,30 µg/L é capaz de diminuir significativamente a atividade das GSTs no fígado e nas brânquias na espécie *Sparus aurata*. Uma das explicativas remete para uma possível repleção da glutatona na sua forma reduzida (GSH) e, uma vez que esta enzima é um cofator das enzimas GSTs, a atividade das GSTs fica comprometida (Torres *et al.*, 2004).

Outro estudo realizado por Li *et al.* (2009) demonstrou que a exposição de *Oncorhynchus myssis* a carbamapexina (0,2 e 2,00 µg/L) durante 42 dias, provocou um stress oxidativo originado por uma diminuição da enzima Glutathione redutase (enzima responsável pela formação da GSH), o que contribui para a diminuição da GSH. Consequentemente, com esta diminuição ocorreu uma inibição das enzimas GSTs.

O oposto é relatado por Nunes *et al.* (2020). Segundo este autor, em situações de stress oxidativo é provável que ocorra, na sequência de um aumento das ERO, um aumento da atividade das GSTs, sendo esta confirmada pela exposição de *Hediste diversicolor* e *Solea senegalensis* durante 28 dias a diclofenac (0,5, 1,0 e 2,0 µg/L) a qual originou um aumento significativo da atividade destas enzimas no fígado sugerindo uma tentativa de eliminação dos compostos tóxicos pelos organismos teste (Nunes *et al.*, 2020).

No entanto, não para o composto em estudo, mas para outros existem semelhanças com os nossos resultados obtidos. É o caso de um estudo recente em que a exposição de *Hediste diversicolor* ao ácido salicílico em concentrações de (50, 75, 112,5, 168,75 e 253,125 µg/L) durante 96 horas, não demonstrou alterações significativas da atividade das GSTs, podendo este acontecimento ser justificado pelo facto de os organismos em estudo não utilizarem a glutathione como via de destoxificação deste composto (Nunes, 2019).

O mesmo pode ter acontecido no presente estudo uma vez que o omeprazol é quase totalmente metabolizado via CYP450, através de reações de hidroxilação catalisadas pela CYP2C19 e reações de sulfonação catalisadas pela CYP2A4, não sendo por isso a conjugação com a glutathione a via preferencial, justificando assim os resultados obtidos. No entanto é de referenciar que a não alteração da atividade desta via enzimática não é indicativa por si só, que não houve resposta de *Salmo trutta fario* após exposição crónica a omeprazol dado que podem estar envolvidas outras vias.

3. TBARS

Durante os processos metabólicos, a produção de forma contínua de ERO pode levar à ativação das defesas antioxidantes a fim de limitar os níveis intracelulares e impedir a indução de danos celulares (Vasconcelos *et al.*, 2014). Nos organismos que habitam em ambientes poluídos gera-se, normalmente, um excesso de ERO através de um ciclo redox induzido pelos agentes poluentes e consequentemente um stress oxidativo (Jesus e de Carvalho, 2008). Quando isto acontece, o composto é visto como tendo uma ação pro-oxidante, isto porque na sua presença ocorre um aumento das atividades das enzimas antioxidantes protetoras, como consequência do aumento da produção de ERO no organismo (Antunes *et al.*, 2010).

Quando produzidos em excesso, as ERO podem reagir com diversas moléculas tais como, por exemplo, os lípidos das membranas biológicas provocando alterações na fisiologia da célula (Bianchi e Antunes, 1999; Janssens *et al.*, 2000). Os fosfolípidos que constituem as membranas celulares ricos em ácidos gordos polinsaturados são alvo de ataques das ERO (Meagher e FitzGerald, 2000; Vasconcelos *et al.*, 2014). Desse ataque resulta a peroxidação lipídica que condiciona diretamente a função da membrana celular, assim

Efeitos ecotoxicológicos em peixes (*Salmo trutta fario*) expostos a concentrações ambientalmente realistas de omeprazol com recurso a biomarcadores de stress oxidativo e peroxidação lipídica

como dos organelos que constituem a célula (De Oliveira e De Souza, 2006). Deste processo resultam substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico tais como o MDA (Meagher e FitzGerald, 2000). Os organismos aquáticos possuem, em comparação com outras espécies, uma maior quantidade de ácidos gordos insaturados sendo por isso mais suscetíveis à PL (Huang *et al.*, 2003).

O MDA é em muitos casos, o aldeído que se forma em maior quantidade durante a PL (Ferreira e Matsubara, 1997), sendo que a sua presença a nível plasmático reflete a magnitude deste processo, assim como a gravidade do stress oxidativo ocorrido (Caldiroli *et al.*, 2020). Este aldeído é uma molécula reativa, tendo como particularidade o ataque de determinados aminoácidos, tal como lisina e o ataque dos grupos aminas presentes nas cabeças dos fosfolípidos (Uchida, 1999) da qual resultam produtos fluorescentes (Uchida, 1999).

Neste estudo não foram evidenciadas alterações estatisticamente significativas em relação ao método das TBARS em ambos os órgãos em estudo após exposição a omeprazol, não sendo por isso expectável a ocorrência de stress oxidativo. No entanto, diversos autores descrevem alterações na quantificação das TBARS quando os organismos são expostos a xenobióticos.

Por exemplo, Nunes *et al.* (2008) demonstrou que após exposição de *Gambusia Holbrooki* por um período de 96 horas a diazepam (várias concentrações), não ocorreram alterações a nível das TBARS, quer nas brânquias quer no fígado.

Outros estudos revelam outro comportamento para o mesmo composto, como é o caso da exposição de *Artemia partherogenetica* em que foi evidenciada uma diminuição significativa das TBARS quando utilizada uma concentração de 7,94 mg/L de diazepam (Nunes *et al.*, 2006). O oposto é descrito por (Martin-Diaz *et al.*, 2009), em que a exposição de *Mytilus Galloprovincialis* à carbamazepina (0,1 e 10g/L) foi responsável por aumentar significativamente o MDA nas brânquias. O facto de o mexilhão ser um invertebrado pode contribuir para tal acontecimento uma vez que as enzimas antioxidantes nos vertebrados e invertebrados são diferentes.

É ainda descrito por Nunes *et al.* (2008) que, após exposição de *Gambusia holbrooki* a clofibrato, é notável a ocorrência de peroxidação lipídica uma vez que ocorreu uma

Efeitos ecotoxicológicos em peixes (*Salmo trutta fario*) expostos a concentrações ambientalmente realistas de omeprazol com recurso a biomarcadores de stress oxidativo e peroxidação lipídica

hiperprodução de ERO e uma deficiência na capacidade de neutralizar as espécies reativas (Nunes *et al.*, 2008).

Os resultados obtidos demonstram que o omeprazol não apresentam um comportamento pró-oxidante, uma vez que a exposição a concentrações realistas deste composto não induziu stress oxidativo dado que respostas protetoras adaptativas foram suficientemente eficazes para minimizar e /ou inibir os danos potencialmente causados pelas EROs em excesso.

III. CONCLUSÃO

Nos últimos anos, a presença de compostos xenobióticos nos ecossistemas aquáticos, aumentou de forma preocupante, devido principalmente às atividades antropogénicas (Cogo *et al.*, 2009).

Com os rápidos avanços nas técnicas analíticas, os contaminantes emergentes foram rapidamente descobertos (Pal *et al.*, 2010). Atualmente, os produtos farmacêuticos humanos e veterinários, assim como produtos de higiene corporal e drogas ilícitas são cada vez mais estudados devido aos efeitos adversos que podem causar (van Nuijs *et al.*, 2010). A sua presença em águas superficiais e os efeitos ecotoxicológicos que estas substâncias podem provocar são motivos de pesquisa (Pal *et al.*, 2010).

As águas residuais assim como hospitalares, industriais e de comércio, são encaminhadas para as ETARes a fim de serem tratadas e devolvidas à natureza (Aguas de Portugal, 2022). Adicionalmente, são também encaminhados fármacos, e/ ou seus metabolitos, assim como produtos de higiene pessoal para estas estações (Kümmerer, 2009).

Nas ETARes as águas passam por várias etapas de depuração antes de estas serem escoadas. No entanto, apesar dos diversos tratamentos nestas executados, os compostos não são removidos de forma eficaz contribuindo assim para a sua chegada e permanência no meio ambiente, através de descargas dos esgotos tratados (Kümmerer, 2009).

Contudo, apesar de existirem cada vez mais estudos ecotoxicológicos que evidenciam os efeitos nocivos das substâncias no meio ambiente, os seus mecanismos toxicológicos ainda não são totalmente esclarecidos (Cleuvers, 2003; Fent *et al.*, 2006).

Os inibidores da bomba de prótons estão entre as classes de medicamentos mais prescritas, destacando-se o omeprazol (Costa e Damascena, 2020). O seu elevado metabolismo contribui para a baixa deteção deste composto no meio ambiente (Boix *et al.*, 2014), embora a sua presença já tenha sido reportada em águas residuais afluentes (van Nuijs *et al.*, 2010). A sua ampla faixa de excreção contribui para a investigação de metabolitos urinários humanos no meio ambiente (Boix *et al.*, 2014).

Efeitos ecotoxicológicos em peixes (*Salmo trutta fario*) expostos a concentrações ambientalmente realistas de omeprazol com recurso a biomarcadores de stress oxidativo e peroxidação lipídica

No presente trabalho experimental não foram evidenciadas alterações estatisticamente significativas em indivíduos de *Salmo trutta fario* após exposição a concentrações ambientalmente realistas de omeprazol parental. Concluindo assim que este fármaco não teve uma ação pro-oxidante nas condições testadas, uma vez que não foram detetadas alterações estatisticamente significativas. É, portanto necessário a realização de testes de toxicidade a uma gama de espécies mais ampla, assim como a determinação de biomarcadores a montante dos testados, nomeadamente SOD e GPX (Pal *et al.*, 2010).

IV. BIBLIOGRAFIA

Agua de Portugal (2022). O ciclo urbano da água. [Em linha]. Disponível em <<https://www.adp.pt/pt/sobre-nos/o-que-fazemos/o-ciclo-urbano-da-agua/?id=28>>. [Consultado em 11/02/2022].

Amorim, L. C. A. (2003). Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, 6(2), pp. 158–170.

Andrade, E. R. *et al.* (2010). Consequences of production of reactive oxygen species in reproduction and main antioxidant mechanisms. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 34(2), pp. 79–86.

Animal Diversity Web (2022). *Salmo trutta*. [Em linha]. Disponível em <https://animaldiversity.org/site/accounts/information/Salmo_trutta.html/#geographic_range>. [Consultado em 09/02/2022].

Antunes, S. C. *et al.* (2010). Testing procedures for the determination of several biomarkers in different species, for environmental assessment of pollution. *Journal of Environmental Monitoring*, 12(8), pp. 1625–1630.

Arikan, O. A., Rice, C. e Codling, E. (2008). Occurrence of antibiotics and hormones in a major agricultural watershed. *Desalination*, 226(1–3), pp. 121–133.

Barbosa, K. B. F. *et al.* (2010). Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Revista de Nutrição*, 23(4), pp. 629–643.

der Beek, T. *et al.* (2016). Pharmaceuticals in the environment-Global occurrences and perspectives. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 35(4), pp. 823–835.

Bernet, D. *et al.* (1999). Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *Journal of Fish Diseases*, 22(1), pp. 25–34.

Efeitos ecotoxicológicos em peixes (*Salmo trutta fario*) expostos a concentrações ambientalmente realistas de omeprazol com recurso a biomarcadores de stress oxidativo e peroxidação lipídica

Bessa, S. S., Ali, E. M. M. e Hamdy, S. M. (2009). The role of glutathione S- transferase M1 and T1 gene polymorphisms and oxidative stress-related parameters in Egyptian patients with essential hypertension. *European Journal of Internal Medicine*, 20(6), pp. 625–630.

Bianchi, M. e Antunes, L. (1999). Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Revista de Nutrição*, 12(2), pp. 123–130.

Bila, D. M. e Dezotti, M. (2003). Fármacos no meio ambiente. *Química Nova*, 26(1), pp. 523–530.

Bila, D. M. e Dezotti, M. (2007). Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. *Química Nova*, 30(3), pp. 651–666.

BioDiversity4all (2022). Truta *Salmo trutta*. [Em linha]. Disponível em <<https://www.biodiversity4all.org/pages/sobre>>. [Consultado em 13/02/2022].

Bisognin, R. P., Wolff, D. B. e Carissimi, E. (2018). Revisão sobre fármacos no ambiente. *Revista DAE*, 66(210), pp. 78–95.

Boix, C. *et al.* (2014). Identification of new omeprazole metabolites in wastewaters and surface waters. *Science of the Total Environment*, 468–469(2014), pp. 706–714.

Bosch, M. *et al.* (2007). Analytical methodologies for the determination of omeprazole: An overview. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 44(4), pp. 831–844.

Bradford, 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(1–2), pp. 248–254.

Brisebois, S., Merati, A. e Giliberto, J. P. (2018). Proton pump inhibitors: Review of reported risks and controversies. *Laryngoscope Investigative Otolaryngology*, 3(6), pp. 457–462.

Brunton, L. L. e Brunton, L. L. (2012). *As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman*. Nova Iorque: Mcgraw Hill.

Efeitos ecotoxicológicos em peixes (*Salmo trutta fario*) expostos a concentrações ambientalmente realistas de omeprazol com recurso a biomarcadores de stress oxidativo e peroxidação lipídica

Buege, J. A. e Aust, S. D. (1978). Microsomal Lipid Peroxidation. *Methods in Enzymology*, 52(C), pp. 302–310.

Cajaraville, M. P. *et al.* (2000). The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: A practical approach. *Science of the Total Environment*, 247(2–3), pp. 295–311.

Caldioli, A. *et al.* (2020). Malondialdehyde and bipolar disorder: A short comprehensive review of available literature. *Journal of Affective Disorders*, 274(2020), pp. 31–37.

Caliman, F. A. e Gavrilescu, M. (2009). Pharmaceuticals, personal care products and endocrine disrupting agents in the environment - A review. *Clean - Soil, Air, Water*, 37(4–5), pp. 277–303.

Calisto, V. e Esteves, V. I. (2009). Psychiatric pharmaceuticals in the environment. *Chemosphere*, 77(10), pp. 1257–1274.

Cederberg, C., Andersson, T. e Skånberg, I. (1989). Omeprazole: pharmacokinetics and metabolism in man. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 24(sup166), pp. 33–40.

Chagas, L. S., Melo, J. I. V. e Freitas, G. R. M. (2020). Inibidores de Bombas de Protons. [Em linha]. Disponível em <<https://www.ufpb.br/cim/contents/menu/publicacoes/cimforma/inibidores-da-bomba-de-protons>>. [Consultado em 11/02/2022].

Chandran, R. *et al.* (2005). Effect of cadmium and zinc on antioxidant enzyme activity in the gastropod, *Achatina fulica*. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, 140(3–4), pp. 422–426.

Christen, V. *et al.* (2010). Highly active human pharmaceuticals in aquatic systems: A concept for their identification based on their mode of action. *Aquatic Toxicology*, 96(3), pp. 167–181.

CIM (2017). *Inibidores da bomba de protões (IBP)*. Lisboa: Centro de Informação do Medicamento.

Cleuvers, M. (2003). Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. *Toxicology Letters*, 142(3), pp. 185–194.

Efeitos ecotoxicológicos em peixes (*Salmo trutta fario*) expostos a concentrações ambientalmente realistas de omeprazol com recurso a biomarcadores de stress oxidativo e peroxidação lipídica

Cogo, A. *et al.* (2009). Utilização de enzimas do estresse oxidativo como biomarcadoras de impactos ambientais. *Natureza Online*, 7(1), pp. 37–42.

Connon, R., Geist, J. e Werner, I. (2012). Effect-Based Tools for Monitoring and Predicting the Ecotoxicological Effects of Chemicals in the Aquatic Environment. *Sensors*, 12, pp. 12741–12771.

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(4), pp. 287–304.

Correia, A. T. *et al.* (2019). Effects of the chronic exposure to cerium dioxide nanoparticles in *Oncorhynchus mykiss*: Assessment of oxidative stress, neurotoxicity and histological alterations. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 68(2019), pp. 27–36.

Correia, A. T. *et al.* (2020). Multi-biomarker approach to assess the acute effects of cerium dioxide nanoparticles in gills, liver and kidney of *Oncorhynchus mykiss*. *Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology*, 238(2020), pp. 1–13.

Costa, C. R. *et al.* (2008). A toxicidade em ambientes aquáticos: Discussão e métodos de avaliação. *Química Nova*, 31(7), pp. 1820–1830.

Costa, M. F. P. (2018). *Efeitos de concentrações ambientalmente relevantes de omeprazol em Sparus aurata: abordagem baseada em biomarcadores*. Universidade Fernando Pessoa.

Costa, M. P. e Damascena, R. S. (2020). Perfil de Usuários de Omeprazol e Considerações Sobre Seu Uso Racional: Uma Revisão Bibliográfica/Profile of Omeprazol Users and Considerations About Their Rational Use: A Bibliographic Review. *ID on line. Revista de Psicologia*, 14(50), pp. 1185–1196.

Costa, S. *et al.* (2016). Estatinas e stresse oxidativo na insuficiência cardíaca crónica. *Revista Portuguesa de Cardiologia*, 35(1), pp. 41–57.

Efeitos ecotoxicológicos em peixes (*Salmo trutta fario*) expostos a concentrações ambientalmente realistas de omeprazol com recurso a biomarcadores de stress oxidativo e peroxidação lipídica

Cristóvão, C. *et al.* (2013). Avaliação do equilíbrio entre oxidantes e antioxidantes na patogénese da doença pulmonar obstrutiva crónica. *Revista Portuguesa de Pneumologia*, 19(2), pp. 70–75.

Cui, G. e Waldum, H. L. (2007). Physiological and clinical significance of enterochromaffin-like cell activation in the regulation of gastric acid secretion. *World Journal of Gastroenterology*, 13(4), pp. 493–496.

Damásio, J. B. *et al.* (2007). Comparing the response of biochemical indicators (biomarkers) and biological indices to diagnose the ecological impact of an oil spillage in a Mediterranean river (NE Catalunya, Spain). *Chemosphere*, 66(7), pp. 1206–1216.

DellaGreca, M. *et al.* (2006). Degradation of lansoprazole and omeprazole in the aquatic environment. *Chemosphere*, 63(7), pp. 1087–1093.

Diario da Republica (2013). *Decreto-Lei n.º 113/2013*. Diario da Republica.

Duan, L. *et al.* (2020). Characteristics of pharmaceutically active compounds in surface water in Beijing, China: Occurrence, spatial distribution and biennial variation from 2013 to 2017. *Environmental Pollution*, 264(2020), pp. 1–8.

El-Serag, H. B. *et al.* (2014). Update on the epidemiology of gastro-oesophageal reflux disease: a systematic review. *Gut*, 63(6), pp. 871–880.

Engevik, A. C., Kaji, I. e Goldenring, J. R. (2020). The physiology of the gastric parietal cell. *Physiological Reviews*, 100(2), pp. 573–602.

Eren, S. H. *et al.* (2018). Serum paraoxonase, arylesterase, and glutathione-s-transferase activities and oxidative stress levels in patients with mushroom poisoning. *Clinics*, 73(16), pp. 1–5.

Fang, Y. Z., Yang, S. e Wu, G. (2002). Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, 18(10), pp. 872–879.

Fent, K., Weston, A. A. e Caminada, D. (2006). Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology*, 76(2), pp. 122–159.

Efeitos ecotoxicológicos em peixes (*Salmo trutta fario*) expostos a concentrações ambientalmente realistas de omeprazol com recurso a biomarcadores de stress oxidativo e peroxidação lipídica

Ferreira, A. L. A. e Matsubara, L. S. (1997). Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica Brasileira*, 43(1), pp. 1–11.

Filho, R. *et al.* (2007). Fármacos, ETEs, e corpos hídricos. *Ambiente e Água: An Interdisciplinary Journal of Applied Science*, 2(3), pp. 54–61.

Fireman, F. A. T. e Fireman, A. K. B. A. T. (1998). Enzimas na alimentação de suínos. *Ciência Rural*, 28(1), pp. 173–178.

Forte, J. G. e Zhu, L. (2009). Apical recycling of the gastric parietal cell H,K-ATPase. *Annual Review of Physiology*, 72, pp. 273–296.

França, B. K. *et al.* (2013). Peroxidação lipídica e obesidade: Métodos para aferição do estresse oxidativo em obesos. *Jornal Português de Gastrenterologia*, 20(5), pp. 199–206.

Gebicka, L. e Krych-Madej, J. (2019). The role of catalases in the prevention/promotion of oxidative stress. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 197(2019), pp. 1–7.

Geraldes, A. M. (1999). *Peixes de Água Doce*. Mirandela: Tipografia Guerra.

Van Gestel, C. A. e Van Brummelen, T. C. (1996). Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms. *Ecotoxicology*, 5(4), pp. 217–225.

Goc, G. *et al.* (2021). Probing the role of Val228 on the catalytic activity of Scytalidium catalase. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1869(8), pp. 1–12.

Golan, D. *et al.* (2012). *Princípios de Farmacologia - A base fisiopatológica da farmacologia*. 3.^a ed. Sao Paulo: Guanabara Koogan.

Gomes, A. e Simon, A. (2017). Inibidores da Bomba de Protões. *E Publicação CIM*, 2(6), pp. 1–3.

Gonçalves, B., Menezes, G. e Rodrigues, A. (2006). Acompanhamento da fase inicial de criação de trutas fário (*Salmo trutta fario*) em cativeiro. *Congresso de Zootecnia*.

Guillén-Sans, R. e Guzmán-Chozas, M. (1998). The thiobarbituric acid (TBA) reaction in foods: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38(4), pp. 315–350.

Efeitos ecotoxicológicos em peixes (*Salmo trutta fario*) expostos a concentrações ambientalmente realistas de omeprazol com recurso a biomarcadores de stress oxidativo e peroxidação lipídica

Guiloski, I. C. *et al.* (2017). Effects of environmentally relevant concentrations of the anti-inflammatory drug diclofenac in freshwater fish *Rhamdia quelen*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 139(2017), pp. 291–300.

Habig, W. H., Pabst, M. J. e Jakoby, W. B. (1974). Glutathione S transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*, 249(22), pp. 7130–7139.

Hamscher, G. *et al.* (2002). Determination of persistent tetracycline residues in soil fertilized with liquid manure by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 74(7), pp. 1509–1518.

Hashemi, S. (2019). Effect of Nanoparticles on Lipid Peroxidation in Plants. em Valenzuela, I. (ed.) *Advances in Lipid Metabolism*. Rijeka: IntechOpen.

Heberer, T. (2002). Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. *Toxicology Letters*, 131(1), pp. 5–17.

Hernández, C. e Ibáñez, P. (2011). Riesgo de eventos adversos gastrointestinales es menor con celecoxib que con la combinación diclofenaco más omeprazol. *Gastroenterologia Latinoamericana*, 22(1), pp. 69–71.

Herrmann, M. *et al.* (2007). Systematic expression profiling of the gastric H⁺/K⁺ ATPase in human tissue. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 42(11), pp. 1275–1288.

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(1–2), pp. 29–34.

Huang, C. H. *et al.* (2003). Dietary vitamin E supplementation affects tissue lipid peroxidation of hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 134(2), pp. 265–270.

Efeitos ecotoxicológicos em peixes (*Salmo trutta fario*) expostos a concentrações ambientalmente realistas de omeprazol com recurso a biomarcadores de stress oxidativo e peroxidação lipídica

Inatomi, N. *et al.* (2016). Potassium-competitive acid blockers: Advanced therapeutic option for acid-related diseases. *Pharmacology and Therapeutics*, 168(10), pp. 12–22.

Islas-Flores, H. *et al.* (2013). Diclofenac-induced oxidative stress in brain, liver, gill and blood of common carp (*Cyprinus carpio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 92(4), pp. 32–38.

Jacob, R. S. *et al.* (2020). Diazepam, metformin, omeprazole and simvastatin: a full discussion of individual and mixture acute toxicity. *Ecotoxicology*, 29(7), pp. 1062–1071.

Jain, K. S. *et al.* (2007). Recent advances in proton pump inhibitors and management of acid-peptic disorders. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 15(3), pp. 1181–1205.

Janssens, B. J. *et al.* (2000). Reduced enzymatic antioxidative defense in deep-sea fish. *Journal of Experimental Biology*, 203(24), pp. 3717–3725.

Jena, A. B. *et al.* (2021). The benzene metabolite p-benzoquinone inhibits the catalytic activity of bovine liver catalase: A biophysical study. *International Journal of Biological Macromolecules*, 167(2021), pp. 871–880.

Jesus, T. B. e de Carvalho, C. E. V. (2008). Utilização de biomarcadores em peixes como ferramenta para avaliação de contaminação ambiental por mercúrio (Hg). *Oecologia Brasiliensis*, 12(4), pp. 1–7.

Kavitha, P. *et al.* (2011). Hepatoprotective activity of Tribulus terrestris extract against acetaminophen-induced toxicity in a freshwater fish (*Oreochromis mossambicus*). *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal*, 47(10), pp. 698–706.

Kim, J. *et al.* (2010). Molecular cloning of *Daphnia magna* catalase and its biomarker potential against oxidative stresses. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, 152(3), pp. 263–269.

Knacker, T. e Metcalfe, C. (2010). Introduction to the special issue on environmental risk assessment of pharmaceuticals. *Integrated Environmental Assessment and Management*, pp. 511–513.

Efeitos ecotoxicológicos em peixes (*Salmo trutta fario*) expostos a concentrações ambientalmente realistas de omeprazol com recurso a biomarcadores de stress oxidativo e peroxidação lipídica

Kosma, C. I., Lambropoulou, D. A. e Albanis, T. A. (2016). Analysis, occurrence, fate and risks of proton pump inhibitors, their metabolites and transformation products in aquatic environment: A review. *Science of the Total Environment*, 569–570(2016), pp. 732–750.

Kosma, C. I., Lambropoulou, D. A. e Albanis, T. A. (2017). Photochemical transformation and wastewater fate and occurrence of omeprazole: HRMS for elucidation of transformation products and target and suspect screening analysis in wastewaters. *Science of the Total Environment*, 590–591(2017), pp. 592–601.

Kumari, R. *et al.* (2022). Nano-bioengineered sensing technologies for real-time monitoring of reactive oxygen species in in vitro and in vivo models. *Microchemical Journal*, 180(2022), p. 107615.

Kümmerer, K. *et al.* (1998). AOX — Emissions from hospitals into municipal waste water. *Chemosphere*, 36(11), pp. 2437–2445.

Kümmerer, K. (2009). The presence of pharmaceuticals in the environment due to human use - present knowledge and future challenges. *Journal of Environmental Management*, 90(8), pp. 2354–2366.

Kümmerer, K., Steger-Hartmann, T. e Meyer, M. (1997). Biodegradability of the anti-tumour agent ifosfamide and its occurrence in hospital effluents and communal sewage. *Water Research*, 31(11), pp. 2705–2710.

Laloo, D. *et al.* (2021). Gastric H⁺, K⁺-ATPase inhibitory effects of the active constituent isolated from *Potentilla fulgens* roots: An in vivo and in silico molecular docking studies. *Phytomedicine Plus*, 1(3), pp. 1–10.

Larsson, D. G. J., de Pedro, C. e Paxeus, N. (2007). Effluent from drug manufactures contains extremely high levels of pharmaceuticals. *Journal of Hazardous Materials*, 148(3), pp. 751–755.

Lasker, J. M. *et al.* (1998). Characterization of CYP2C19 and CYP2C9 from human liver: Respective roles in microsomal tolbutamide, S-mephenytoin, and omeprazole hydroxylations. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 353(1), pp. 16–28.

Efeitos ecotoxicológicos em peixes (*Salmo trutta fario*) expostos a concentrações ambientalmente realistas de omeprazol com recurso a biomarcadores de stress oxidativo e peroxidação lipídica

Leme, P. L. S. *et al.* (2003). Exclusão gastroduodenal e vagotomia troncular: repercussão no peso corporal e gastrinemia- estudo experimental em ratos. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*, 30(6), pp. 416–423.

Leon, J. A. D. De e Borges, C. R. (2020). Evaluation of oxidative stress in biological samples using the thiobarbituric acid reactive substances assay. *Journal of Visualized Experiments*, 2020(159), pp. 1–10.

Li, D. *et al.* (2008). Determination of penicillin G and its degradation products in a penicillin production wastewater treatment plant and the receiving river. *Water Research*, 42(1–2), pp. 307–317.

Li, Z.-H. *et al.* (2009). Responses of antioxidant status and Na⁺–K⁺-ATPase activity in gill of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, chronically treated with carbamazepine. *Chemosphere*, 77(11), pp. 1476–1481.

Lima, É. S. e Abdalla, D. S. P. (2001). Peroxidação lipídica: Mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Revista Brasileira de Ciências Farmaceuticas*, 37(3), pp. 293–303.

Lin, A. Y.-C., Yu, T.-H. e Lin, C.-F. (2008). Pharmaceutical contamination in residential, industrial, and agricultural waste streams: risk to aqueous environments in Taiwan. *Chemosphere*, 74(1), pp. 131–141.

Lundell, L. *et al.* (2015). Systematic review: The effects of long-term proton pump inhibitor use on serum gastrin levels and gastric histology. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 42(6), pp. 649–663.

Luo, H. *et al.* (2018). Changes in proton pump inhibitor prescribing trend over the past decade and pharmacists' effect on prescribing practice at a tertiary hospital. *BMC Health Services Research*, 18(1), p. 537.

Madureira, T. V. *et al.* (2010). Spatiotemporal distribution of pharmaceuticals in the Douro River estuary (Portugal). *Science of The Total Environment*, 408(22), pp. 5513–5520.

Efeitos ecotoxicológicos em peixes (*Salmo trutta fario*) expostos a concentrações ambientalmente realistas de omeprazol com recurso a biomarcadores de stress oxidativo e peroxidação lipídica

Man, Y. *et al.* (2022). Combined effect of tetracycline and copper ion on catalase activity of microorganisms during the biological phosphorus removal. *Journal of Environmental Management*, 304(2022), pp. 1–7.

Manno, M. *et al.* (2010). Biomonitoring for occupational health risk assessment (BOHRA). *Toxicology Letters*, 192(1), pp. 3–16.

Marić, S. *et al.* (2012). Record of the brown trout *Salmo trutta* L., 1758 in the main riverbed of the Serbian part of the Danube River. *Journal of Applied Ichthyology*, 28(1), pp. 135–137.

Martin-Diaz, L. *et al.* (2009). Effects of environmental concentrations of the antiepileptic drug carbamazepine on biomarkers and cAMP-mediated cell signaling in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic Toxicology*, 94(3), pp. 177–185.

Martins, R. *et al.* (2019). Efeitos da desprescrição de inibidores de bomba de prótons. *Anais da Faculdade de Medicina de Olinda*, 1(4), pp. 56–60.

Mastrángelo, M. e Ferrari, L. (2013). *Cnesterodon decemmaculatus* Juveniles as test organisms in toxicity assessment: Cadmium case. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 91(1), pp. 49–54.

McEneff, G., Schmid, W. e Quinn, B. (2015). *Pharmaceuticals in the Aquatic Environment: A Short Summary of Current Knowledge and the Potential Impacts on Aquatic Biota and Humans*. Environmental Protection Agency. Irlanda.

Meagher, E. A. e Fitzgerald, G. A. (2000). Indices of lipid peroxidation in vivo: Strengths and limitations. *Free Radical Biology and Medicine*, 28(12), pp. 1745–1750.

Mescher, A. L. (2018). *Junqueira Basic Histology: Text and Atlas*. Nova Iorque: McGraw Hill.

Moon, T. W., Walsh, P. J. e Mommsen, T. P. (1985). Fish Hepatocytes: A Model Metabolic System. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 42(11), pp. 1772–1782.

National Research Council (1987). Biological markers in environmental health research. *Environmental Health Perspectives*, 74(4), pp. 1–191.

Efeitos ecotoxicológicos em peixes (*Salmo trutta fario*) expostos a concentrações ambientalmente realistas de omeprazol com recurso a biomarcadores de stress oxidativo e peroxidação lipídica

van Nuijs, A. L. N. *et al.* (2010). Optimization and validation of a hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of 13 top-prescribed pharmaceuticals in influent wastewater. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 398(5), pp. 2211–2222.

Nunes, B. *et al.* (2008). Behaviour and biomarkers of oxidative stress in *Gambusia holbrooki* after acute exposure to widely used pharmaceuticals and a detergent. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 71(2), pp. 341–354.

Nunes, B. (2011). A presença de fármacos no ambiente. *Acta Farmacêutica Portuguesa*, 1(1), pp. 43–54.

Nunes, B., *et al.* (2015a). Ecotoxicological effect of zinc pyrithione in the freshwater fish *Gambusia holbrooki*. *Ecotoxicology*, 24(9), pp. 1896–1905.

Nunes, B., *et al.* (2015b). Ecotoxicological effects of salicylic acid in the freshwater fish *Salmo trutta fario*: Antioxidant mechanisms and histological alterations. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(1), pp. 667–678.

Nunes, B. (2019). Acute ecotoxicological effects of salicylic acid on the Polychaeta species *Hediste diversicolor*: evidences of low to moderate pro-oxidative effects. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(8), pp. 7873–7882.

Nunes, B. *et al.* (2020). Toxic effects of environmentally realistic concentrations of diclofenac in organisms from two distinct trophic levels, *Hediste diversicolor* and *Solea senegalensis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology*, 231(2020), pp. 1–14.

Nunes, B., Carvalho, F. e Guilhermino, L. (2006). Effects of widely used pharmaceuticals and a detergent on oxidative stress biomarkers of the crustacean *Artemia parthenogenetica*. *Chemosphere*, 62(4), pp. 581–594.

OCDE (1998). *OECD Guideline for testing of chemicals*. Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico.

Okamoto, C. T., Asano, S. e Sakai, H. (2018). The Cell Biology of Gastric Acid Secretion. em Said, H. (ed.) *Physiology of the Gastrointestinal Tract*. Academic Press, pp. 831–867.

Efeitos ecotoxicológicos em peixes (*Salmo trutta fario*) expostos a concentrações ambientalmente realistas de omeprazol com recurso a biomarcadores de stress oxidativo e peroxidação lipídica

Oliveira, M. *et al.* (2010). Antioxidant responses versus DNA damage and lipid peroxidation in golden grey mullet liver: A field study at ria de aveiro (Portugal). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 59(3), pp. 454–463.

De Oliveira, M. C. e De Souza, V. H. E. (2006). Utilização de biomarcadores de estresse oxidativo no monitoramento ambiental. *Revista Uningá*, 10(1), pp. 1–9.

der Oost, R., Beyer, J. e Vermeulen, N. P. E. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: A review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13(2), pp. 57–149.

Otake, K. *et al.* (2016). Characteristics of the Novel Potassium-Competitive Acid Blocker Vonoprazan Fumarate (TAK-438). *Advances in Therapy*, 33(7), pp. 1140–1157.

Pal, A. *et al.* (2010). Impacts of emerging organic contaminants on freshwater resources: Review of recent occurrences, sources, fate and effects. *Science of the Total Environment*, 408(24), pp. 6062–6069.

Paz, M. F. C. J. *et al.* (2020). Pharmacological Effects and Toxicogenetic Impacts of Omeprazole: Genomic Instability and Cancer. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020, pp. 1–21.

Pereira, B. V. R. (2018). *Efeitos agudos e crônicos dos fármacos paracetamol e propranolol em diferentes biomarcadores de uma espécie de peixe neotropical*. Universidade Federal de São Carlos.

Petrović, M., Gonzalez, S. e Barceló, D. (2003). Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 22(10), pp. 685–696.

Ramsay, P. T. e Carr, A. (2011). Gastric acid and digestive physiology. *Surgical Clinics*, 91(5), pp. 977–982.

Rang, H. P. *et al.* (2016). *Pharmacology*. London: Elsevier Churchill Livingstone.

Ray, P. D., Huang, B.-W. e Tsuji, Y. (2012). Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular Signalling*, 24(5), pp. 981–990.

Efeitos ecotoxicológicos em peixes (*Salmo trutta fario*) expostos a concentrações ambientalmente realistas de omeprazol com recurso a biomarcadores de stress oxidativo e peroxidação lipídica

Regitano, J. B. e Leal, R. M. P. (2010). Performance and environmental impact of antibiotics in animal production in Brazil. *Revista Brasileira de Ciencia do Solo*, 34(3), pp. 601–616.

Ribeiro, N. U. F. e Américo-Pinheiro, J. H. P. (2018). Peixes como bioindicadores de agrotóxicos em ambientes aquáticos. *Revista Científica ANAP Brasil*, 11(22), pp. 1–8.

Ribeiro, S. M. R. *et al.* (2005). A formação e os efeitos das especies reativas de oxigenio no meio biológico. *Bioscience Journal*, 21(3), pp. 133–149.

Del Rio, D., Stewart, A. J. e Pellegrini, N. (2005). A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 15(4), pp. 316–328.

Roche, V. F. (2006). The chemically elegant proton pump inhibitors. *American Journal of Pharmaceutical Education*, 70(5), p. 101.

Rodrigues, E. T. *et al.* (2020). Cell-based assays as an alternative for the study of aquatic toxicity of pharmaceuticals. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(7), pp. 7145–7155.

Rodrigues, S. R. *et al.* (2011). Cholinesterase (ChE) inhibition in pumpkinseed (*Lepomis gibbosus*) as environmental biomarker: ChE characterization and potential neurotoxic effects of xenobiotics. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 99(2), pp. 181–188.

Roguska, A. *et al.* (2021). Mediatorless electrocatalytic oxygen reduction with catalase on mercury–gold amalgam microelectrodes. *Electrochemistry Communications*, 133(2021), pp. 1–12.

Rosal, R. *et al.* (2010). Occurrence of emerging pollutants in urban wastewater and their removal through biological treatment followed by ozonation. *Water research*, 44(2), pp. 578–588.

Sachs, G., Shin, J. M. e Howden, C. W. (2006). Review article: The clinical pharmacology of proton pump inhibitors. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 23(Suppl: 2), pp. 2–8.

Efeitos ecotoxicológicos em peixes (*Salmo trutta fario*) expostos a concentrações ambientalmente realistas de omeprazol com recurso a biomarcadores de stress oxidativo e peroxidação lipídica

Sachs, G. e Wallmark, B. (1989). The gastric H⁺, K⁺-ATPase: the site of action of omeprazole. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 24(sup166), pp. 3–11.

Santos, L. H. M. L. M. *et al.* (2010). Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *Journal of Hazardous Materials*, 175(1), pp. 45–95.

Savarino, V., Di Mario, F. e Scarpignato, C. (2009). Proton pump inhibitors in GORD: an overview of their pharmacology, efficacy and safety. *Pharmacological Research*, 59(3), pp. 135–153.

Schubert, M. L. (2004). Gastric secretion. *Current opinion in gastroenterology*, 20(6), pp. 519–525.

Schubert, M. L. (2017). Physiologic, pathophysiologic, and pharmacologic regulation of gastric acid secretion. *Current Opinion in Gastroenterology*, 33(6), pp. 430–438.

Schultz, M., Dutta, S. e Tew, K. D. (1997). Inhibitors of glutathione S-transferases as therapeutic agents. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 26(2), pp. 91–104.

Seeley, R. R., Stephens, T. D. e Tate, P. (2011). *Anatomia e Fisiologia*. Loures: Lusociência.

Shaeer, A. *et al.* (2022). Role of C-terminal domain in a manganese-catalase from *Geobacillus thermopakistaniensis*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 134(3), pp. 203–212.

Shehna Mahim, S. *et al.* (2021). Oxidative stress responses of a freshwater fish, *Labeo rohita*, to a xenobiotic, bisphenol S. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 35(8), p. e22820.

Shi, S. e Klotz, U. (2008). Proton pump inhibitors: An update of their clinical use and pharmacokinetics. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 64(10), pp. 935–951.

Efeitos ecotoxicológicos em peixes (*Salmo trutta fario*) expostos a concentrações ambientalmente realistas de omeprazol com recurso a biomarcadores de stress oxidativo e peroxidação lipídica

Shimizu, M. *et al.* (2006). Sensitive determination of omeprazole and its two main metabolites in human plasma by column-switching high-performance liquid chromatography: Application to pharmacokinetic study in relation to CYP2C19 genotypes. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 832(2), pp. 241–248.

Shin, J. M. e Sachs, G. (2008). Pharmacology of proton pump inhibitors. *Current Gastroenterology Reports*, 10(6), pp. 528–534.

Shlafer, M. e Shepard, B. M. (1984). A method to reduce interference by sucrose in the detection of thiobarbituric acid-reactive substances. *Analytical Biochemistry*, 137(2), pp. 269–276.

Siddique, T., Deng, H. X. e Ajroud-Driss, S. (2013). Motor Neuron Disease. em Rimoin, D., Pyeritz, R., e Korf, B. (eds.) *Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics*. Oxford: Academic Press, pp. 1–22.

Siraki, A. G. *et al.* (2002). Endogenous and endobiotic induced reactive oxygen species formation by isolated hepatocytes. *Free Radical Biology and Medicine*, 32(1), pp. 2–10.

Sogorb, M. A. *et al.* (2014). An integrated approach for detecting embryotoxicity and developmental toxicity of environmental contaminants using in vitro alternative methods. *Toxicology Letters*, 230(2), pp. 356–367.

Srivastava, S. K. *et al.* (1999). Differential catalytic efficiency of allelic variants of human glutathione S-transferase Pi in catalyzing the glutathione conjugation of thiotepa. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 366(1), pp. 89–94.

Stadtman, E. R. (2002). Importance of individuality in oxidative stress and aging. *Free Radical Biology and Medicine*, 33(5), pp. 597–604.

StringFixer (2022). *Salmo trutta fario*. [Em linha]. Disponível em <https://stringfixer.com/pt/Salmo_trutta_fario>. [Consultado em 17/02/2022].

Tanaka, S. *et al.* (2002). Gastric acid secretion in L-histidine decarboxylase-deficient mice. *Gastroenterology*, 122(1), pp. 145–155.

Efeitos ecotoxicológicos em peixes (*Salmo trutta fario*) expostos a concentrações ambientalmente realistas de omeprazol com recurso a biomarcadores de stress oxidativo e peroxidação lipídica

Torres, M. C. L., Soares, N. de F. F. e Maia, J. F. (2004). Parâmetros cinéticos da Glutathione S-Transferase e sua ativação por extratos de vegetais. *Food Science and Technology*, 24(2), pp. 243–248.

Torres, M. C. L., Soares, N. de F. F. e Pereira, J. A. M. (2006). Extração, purificação e avaliação da atividade da glutathione S-Transferase de fígado bovino. *Ciência e Agrotecnologia*, 30(2), pp. 302–307.

Trute, M. *et al.* (2007). Characterization of hepatic glutathione S-transferases in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Aquatic Toxicology*, 81(2), pp. 126–136.

Tuerlinckx, M. *et al.* (2018). Avaliação da atividade da enzima glutathione-s-transferase da minhoca *Eisenia foetida* exposta à ivermectina. *Acta Toxicológica Argentina*, 26(2), pp. 71–82.

Turrens, J. F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *Journal of Physiology*, 552(2), pp. 335–344.

Uchida, K. (1999). Current status of acrolein as a lipid peroxidation product. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 9(5), pp. 109–113.

Vannucchi, H. *et al.* (1998). Papel dos nutrientes na peroxidação lipídica e no sistema de defesa antioxidante. *Medicina (Ribeirão Preto)*, 31(1), pp. 31–44.

Vasconcelos, T. B. de *et al.* (2014). Radicais livres e antioxidantes : proteção ou perigo? *UNOPAR Científica. Ciências Biológicas e da Saúde*, 16(3), pp. 213–219.

Vlahogianni, T. *et al.* (2007). Integrated use of biomarkers (superoxide dismutase, catalase and lipid peroxidation) in mussels *Mytilus galloprovincialis* for assessing heavy metals' pollution in coastal areas from the Saronikos Gulf of Greece. *Marine Pollution Bulletin*, 54(9), pp. 1361–1371.

Wang, Y. *et al.* (2018). Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. *Journal of Cell Biology*, 217(6), pp. 1915–1928.

Ward, R. M. e Kearns, G. L. (2013). Proton pump inhibitors in pediatrics: Mechanism of action, pharmacokinetics, pharmacogenetics, and pharmacodynamics. *Pediatric Drugs*, 15(2), pp. 119–131.

Efeitos ecotoxicológicos em peixes (*Salmo trutta fario*) expostos a concentrações ambientalmente realistas de omeprazol com recurso a biomarcadores de stress oxidativo e peroxidação lipídica

Weigel, S., Kuhlmann, J. e Hühnerfuss, H. (2002). Drugs and personal care products as ubiquitous pollutants: occurrence and distribution of clofibric acid, caffeine and DEET in the North Sea. *Science of the Total Environment*, 295(1–3), pp. 131–141.

WHO International Programme on Chemical Safety (IPCS) (1993). *Biomarkers and risk assessment: concepts and principles. Environmental Health Criteria*. Geneva.

Wilson, J. M., Bunte, R. M. e Carty, A. J. (2009). Evaluation of rapid cooling and tricaine methanesulfonate (MS222) as methods of euthanasia in zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 48(6), pp. 785–789.

Wilson, R. e Stevenson, C. (2019). Anatomy and Physiology of the Stomach. em, pp. 634–646.

Yao, X. e Forte, J. G. (2003). Cell Biology of Acid Secretion by the Parietal Cell. *Annual Review of Physiology*, 65, pp. 103–131.

Zhang, X. *et al.* (2008). Induction of hepatic enzymes and oxidative stress in Chinese rare minnow (*Gobiocypris rarus*) exposed to waterborne hexabromocyclododecane (HBCDD). *Aquatic Toxicology*, 86(1), pp. 4–11.

Zorita, I. *et al.* (2007). Assessment of biological effects of environmental pollution along the NW Mediterranean Sea using mussels as sentinel organisms. *Environmental Pollution*, 148(1), pp. 236–250.