

MESTRADO

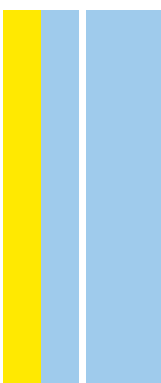
TOXICOLOGIA E CONTAMINAÇÃO AMBIENTAIS

# Estudo toxicológico dos efeitos de um fármaco de uso humano (diclofenac), ao longo de uma cadeia trófica simulada em ambiente marinho.

Joseane Augusta Barros

**M**

**2017**

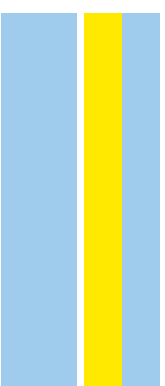


**Joseane Augusta Barros.** Estudo toxicológico dos efeitos de um fármaco de uso humano (diclofenac), ao longo de uma cadeia trófica simulada em ambiente marinho.



Estudo toxicológico dos efeitos de um fármaco de uso humano (diclofenac), ao longo de uma cadeia trófica simulada em ambiente marinho.

Joseane Augusta Andrade Barros



Joseane Augusta Andrade Barros

**Estudo toxicológico dos efeitos de um fármaco de uso humano (diclofenac) ao longo de uma cadeia trófica simulada em ambiente marinho**

Dissertação de Candidatura ao grau de Mestre em Toxicologia e Contaminação Ambientais submetida ao Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar e Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.

Orientador: Bruno André Fernandes de Jesus da Silva Nunes

Categoria: Investigador

Afiliação: Departamento de Biologia/Centro de Estudos do Ambiente e do Mar (CESAM Laboratório Associado), Universidade de Aveiro

Coorientador: Alberto Teodorico Rodrigues Moura Correia

Categoria: Professor Auxiliar

Afiliação: Universidade Fernando Pessoa/Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental



*“It is not the strongest or the most intelligent who will survive but those who can best manage change”.*

**Charles Darwin (1809-1882)**

# Agradecimentos

A conclusão desta dissertação de Mestrado não teria sido possível sem ajuda dos meus orientadores, o Doutor Bruno André Fernandes de Jesus da Silva Nunes e o Prof. Doutor Alberto Teodorico Rodrigues Moura Correia. Aprecio o tempo disponibilizado, a paciência, o conhecimento transmitido, e o apoio que me deram em momentos importantes deste estudo. Agradeço os conselhos transmitidos, não meramente académicos/profissionais, mas também pessoais, que, sem dúvida, irão ser sempre relevantes nos projetos futuros, e a disponibilidade para ouvir as minhas limitações. A empatia demonstrada por todos foi, sem dúvida, o que mais me encorajou a continuar até ao fim.

Não podia, também, deixar de agradecer à Ana Gomes, Sara Rodrigues, Rayda Ghribi, Johnatas Alvez, Marcelo Soeth, André, Marta Peniche, Cláudia Moreira, Susana Barros e à equipa do BOGA.

Quero também agradecer de uma forma muito especial à Gisela Canela, que foi incansável no apoio à realização desta dissertação. Serei sempre grata.

Os amigos, como sempre, são cruciais nestes momentos, e, por isso, agradeço à Cátia Oliveira, Kaori Fonseca, Jossara Almeida, Evelyn Oliveira, Ivanilda de Pina, Márcio Ribeiro, Christopher Miranda, André Correia de Sá, Osvaldo Semedo, Márcio Cardinal, Rafaela Mendes.

Por último, mas não menos relevante, quero agradecer à minha família, aos meus pais, pela oportunidade de ter uma formação académica, em especial à minha irmã Janine Augusta de Jesus Andrade Barros, ao meu primo Paulo Mendes e à minha prima Vanda Barros.

A todos, muito obrigada!

# Resumo

Os fármacos fazem parte do nosso quotidiano e são utilizados com vários propósitos, incluindo a medicina veterinária, agricultura e aquacultura. Por não serem totalmente eliminados nas Estações de Tratamento de Águas Residuais (ETAR), tendem a surgir em grandes quantidades no ambiente aquático. O diclofenac (DFC) é um dos anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) mundialmente mais prescritos, em virtude das suas propriedades anti-inflamatórias, analgésicas e antipiréticas. Isto justifica o facto de ser um dos fármacos mais frequentemente detetados nos compartimentos aquáticos, na gama dos  $\mu\text{g/L}$ . A entrada contínua desta substância no compartimento aquático pode ser propensa a provocar efeitos nefastos na biota, especialmente quando de forma crónica e pela via da cadeia trófica, revelando-se, portanto, um importante problema ecológico.

No presente trabalho, foram analisados os efeitos ecotoxicológicos do DFC em duas espécies marinhas: o poliqueta *Hediste diversicolor* e o peixe *Solea senegalensis*. A análise de um biomarcador de neurotoxicidade — a atividade da acetilcolinesterase (AChE) — foi realizada após exposições crónicas (exposição pela água) e por via trófica (ingestão de alimento previamente contaminando) de 28 dias, com diferentes concentrações de DCF (0,5, 1 e 2  $\mu\text{g/L}$ ). Os resultados deste trabalho demonstram que a exposição crónica dos indivíduos de *H. diversicolor* e *S. senegalensis* ao DCF via água não influencia a atividade da enzima AChE. No entanto, no ensaio onde os indivíduos de *S. senegalensis* foram expostos via alimento (por ingestão de poliquetas de *H. diversicolor* previamente expostas a DCF), houve diferenças significativas entre tratamentos, com diminuição da atividade da enzima AChE na concentração de 2  $\mu\text{g/L}$  do fármaco. Portanto, o DFC é um composto bioacumulável, podendo afetar a cadeia trófica e causar alterações no ecossistema aquático.

**Palavras-chave:** AINEs; *Hediste diversicolor*; *Solea senegalensis*;  
acetilcolinesterase (AChE); fármacos no ambiente

# Abstract

Pharmaceuticals are part of our everyday lives including veterinary medicine, agriculture, and aquaculture activities. Due to a substantial utilization, therapeutic compounds tend to appear in large quantities in the environment, especially in the aquatic environment. Diclofenac (DFC) is one of the most commonly prescribed non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). Due to its anti-inflammatory, analgesic and antipyretic properties, DFC is highly prescribed worldwide, which justifies the fact that it is one of the drugs most frequently detected in aquatic compartments, in the  $\mu\text{g/L}$  range. The continued disposal of this substance into the aquatic environment through wastewater treatment processes can cause harmful effects on biota. Especially, when the disposal is done chronically and via the food chain, which can result in a major ecological problem.

In the present work, the ecotoxicological effects of DCF were analyzed using two marine species: *Hediste diversicolor* and *Solea senegalensis*. The analysis of a neurotoxicity biomarker - acetylcholinesterase (AChE) - was performed after chronic and trophic exposures to different concentrations of DCF (0.5, 1 and 2  $\mu\text{g/L}$ ), during 28 days. The results of this work demonstrated that chronic exposure of *H. diversicolor* and *S. senegalensis* individuals to DCF via water does not influence AChE enzyme activity. However, in the experiment in which *S. senegalensis* individuals were exposed via food (polychaetes *H. diversicolor*), previously contaminated with DCF, there were statistically significant differences between treatments, with a decrease in AChE enzyme activity at the highest concentration of the drug (2  $\mu\text{g/L}$ ). Therefore, DFC is a bioaccumulative compound that can affect the trophic chain, and cause changes in the aquatic ecosystem.

**Key-words:** NSAIDs; *Hediste diversicolor*; *Solea senegalensis*; acetylcholinesterase (AChE); drugs in the environment

# Índice

<b>Agradecimentos</b> .....	iii
<b>Resumo</b> .....	iv
<b>Abstract</b> .....	v
<b>Índice</b> .....	vi
<b>Lista de Figuras</b> .....	viii
<b>Abreviaturas</b> .....	ix
<b>1. Introdução</b> .....	1
1.1. Fármacos no ambiente.....	1
1.2. Atividade farmacológica e toxicológica do DCF.....	5
1.3. Diclofenac (DCF): (eco)toxicologia e presença no ambiente aquático .....	7
1.4. Possibilidade de contaminação ao longo da cadeia trófica.....	9
1.5. Acetilcolinesterase (AChE).....	10
1.6. Poliquetas como organismos-teste em ecotoxicologia.....	12
1.7. Peixes pleuronectiformes .....	14
1.8. Objetivos.....	16
<b>2. Materiais e métodos</b> .....	<b>17</b>
2.1. Substância-teste .....	17
2.2. Organismos-teste.....	17
2.2.1. <i>Hediste diversicolor</i> .....	17
2.2.1.1. Exposição crónica de <i>H. diversicolor</i> .....	18

2.2.2. Exposição do peixe <i>S. senegalensis</i> .....	21
2.2.2.2. Ensaio de transferência do tóxico ao longo da cadeia trófica .....	23
2.3. Quantificação da atividade da AChE .....	24
2.4. Análise estatística .....	25
<b>3. Resultados</b> .....	<b>25</b>
3.1. Poliquetas expostos através da água .....	25
3.2. Peixes expostos através da água .....	27
3.3. Peixes expostos através do alimento .....	28
<b>4. Discussão</b> .....	<b>29</b>
<b>5. Conclusão e perspectivas futuras</b> .....	<b>33</b>
<b>Bibliografia</b> .....	<b>34</b>

## Lista de Figuras

<b>Fig. 1</b> – Estrutura química do diclofenac. Fonte: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">www.ncbi.nlm.nih.gov</a> (2017).....	<b>5</b>
<b>Fig. 2</b> – Ação da enzima acetiltransferase (ChAT) na síntese do neurotransmissor acetilcolina (ACh) a partir da acetilcoenzima A (Acetil-CoA) e colina.....	<b>11</b>
<b>Fig. 3</b> – Poliqueta <i>Hediste diversicolor</i> (foto do autor) .....	<b>13</b>
<b>Fig. 4</b> – <i>Solea Senegalensis</i> (A) (foto do autor), B. Distribuição geográfica do linguado Fonte: <a href="http://www.aquamaps.org">www.aquamaps.org</a> (2017).....	<b>15</b>
<b>Fig. 5</b> – Exposição crónica de <i>H. diversicolor</i> (foto do autor).....	<b>19</b>
<b>Fig. 6</b> – Sistema utilizado para o ensaio de contaminação dos poliquetas (foto do autor).....	<b>20</b>
<b>Fig. 7</b> – Exposição crónica de <i>S. senegalensis</i> (foto do autor).....	<b>22</b>
<b>Fig. 8</b> – Atividade da enzima AChE em indivíduos de <i>H. diversicolor</i> expostos cronicamente (28 dias) a diferentes concentrações de diclofenac. Valores correspondentes à média de três réplicas $\pm$ erro padrão.....	<b>26</b>
<b>Fig. 9</b> – Atividade da enzima AChE em indivíduos de <i>S. senegalensis</i> expostos cronicamente (28 dias) a diferentes concentrações de diclofenac, Valores correspondentes à média de três réplicas $\pm$ erro padrão.....	<b>27</b>
<b>Fig. 10</b> – Atividade da enzima AChE em indivíduos de <i>S. senegalensis</i> expostos cronicamente (28 dias) através do alimento, Valores correspondentes à média de três réplicas $\pm$ erro padrão. *- Diferenças significativas em relação ao controlo, $p < 0,05$ .....	<b>28</b>

# Abreviaturas

**AAS** – Ácido acetilsalicílico;

**AChE** – Acetilcolinesterase;

**AFN** – Ácido mefenâmico;

**AINE** – Anti-inflamatório não esteroide;

**BCF** – Fatores de bioconcentração;

**CAT** – Catalase;

**CB** – Carbamato;

**ChE** – Colinesterase;

**CYP450** – Citocromo P450;

**ETAR** – Estação de tratamento de águas residuais;

**DCF** – Diclofenac;

**GPx** – Glutaciona peroxidase;

**GR** – Glutaciona redutase;

**GST** – Glutaciona-s-transferase;

**IBP** – Ibuprofeno;

**LPO** – Peroxidação lipídica;

**NAP** – Naproxeno;

**OP** – Organofosforados;

**SOD** – Superóxido dismutase.



# 1. Introdução

## 1.1. Fármacos no ambiente

A descoberta dos fármacos foi um dos acontecimentos mais marcantes na história do Homem. Sendo a doença tão antiga como o Homem, há mais de 80 000 anos que o instinto conduziu as pessoas do Paleolítico a procurarem e a distinguirem plantas e substâncias de origem animal como remédio para hostilizar a doença [1]. Com o aumento da população e número de doenças tratáveis, o uso dos fármacos tem sido cada vez mais amplo e, sempre com o intuito de melhorar a qualidade de vida.

De acordo com o relatório de monitorização mensal da Infarmed (Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde), em julho de 2016 foram dispensados 91 milhões de embalagens de medicamentos nas farmácias portuguesas, comprovando, mais uma vez, esta tendência de aumento [2].

No ano de 2014 foram vendidas (com prescrição médica) em Portugal 6 milhões de embalagens de anti-inflamatório não esteroide (AINEs) [3]. Este grupo de fármacos representa uma das classes farmacoterapêuticas mais utilizadas a nível mundial, sendo prescritos em várias áreas clínicas para resolução de patologias dolorosas e/ou de base inflamatória [4,5].

Com várias finalidades benéficas, os fármacos são utilizados no tratamento (cura/mitigação), alteração ou prevenção de doenças, no diagnóstico e no melhoramento das condições de saúde [6,7]. Além disso, são utilizados, também, no âmbito da medicina veterinária, agricultura e aquacultura [7,8].

As propriedades particulares dos fármacos favorecem a bioacumulação e transferência dos seus resíduos para organismos de níveis tróficos superiores [9,10]. Segundo Santos *et al* [11]., de forma a avaliar os efeitos tóxicos nos organismos não-alvo de maneira mais abrangente, deve-se incluir o desenvolvimento de testes específicos que envolvam a avaliação e quantificação de efeitos crónicos, ou seja, através da exposição a diferentes concentrações de

um composto químico durante um período de tempo prolongado e que seja representativo do ciclo de vida do organismo teste.

Uma serie de características dos fármacos são distintivas comparativamente à maioria dos restantes contaminantes ambientais, sendo, portanto, o estudo dos seus efeitos ambientais fundamental [12,13]. São desenhados de forma a terem um modo de ação específico e exercerem atividade biológica numa variedade de espécies; são maioritariamente lipofílicos, de forma a maximizar a sua absorção; a sua degradação gera a libertação de novas moléculas, muitas vezes desconhecidas do ponto de vista farmacológico/toxicológico; são pseudopersistente, uma vez que a sua introdução contínua excede a capacidade de degradação e atenuação ambiental; e, podem, também interagir com resíduos de outros fármacos no ambiente [14,15].

As consequências adversas causadas pela presença destas substâncias no compartimento aquático têm despertado a atenção da comunidade científica, apesar de se saber pouco sobre os seus efeitos ecotoxicológicos [16]. Dada a importância do ambiente aquático para o homem, pois serve de recurso para várias atividades indispensáveis à sua sobrevivência, é fulcral perceber os efeitos nefastos causados por estes xenobióticos neste meio recetor, de forma a minimizar os danos causados e evitar que sejam irreversíveis [17]. Não obstante, o reconhecimento desta situação foi algo recente, pois só no ano de 1970 foi, pela primeira vez, relatada a presença de fármacos em águas residuais nos Estados Unidos da América [18].

Apesar destes esforços iniciais, a presença de substâncias de utilização terapêutica no compartimento aquático foi menosprezada até à década de 1990, altura em que foi estabelecida a ligação entre o uso de estrogénios sintéticos, como agentes de controlo da natalidade (etinilestradiol), e os impactos reprodutivos e comportamentais em peixes [11,19,20]. Desde então, os fármacos foram reconhecidos como contaminantes ubíquos do ambiente aquático, libertados maioritariamente por intermédio de efluentes de águas residuais [21]. Ainda que as concentrações dessas substâncias nos diferentes compartimentos aquáticos sejam relativamente baixas (habitualmente de ng/L a µg/L), muitos organismos não-alvo podem ser inadvertidamente expostos à libertação desses compostos ativos no ambiente [22,23]. Nesse sentido, surgiu a necessidade de proteger os recursos hídricos da presença de elevados níveis de substâncias farmacêuticas; em 1995 foi estabelecido, pela primeira vez, o requisito para

avaliação dos riscos ambientais dos produtos farmacêuticos, de acordo com a Diretiva da União Europeia (UE) 92/18 CEE [24].

Os fármacos, incluindo os seus metabolitos e conjugados, são frequentemente detetados em ambientes aquáticos, como água superficial marinha, rios, lagos, águas subterrâneas e até em fontes de água potável [22,25]. Esses podem atingir o ambiente aquático através de várias vias, que derivam essencialmente da sua excreção por intermédio de fezes e urina, após uso na terapêutica. De acordo com o estudo conduzido por Landry e Boyer [26], aproximadamente 64% dos produtos farmacêuticos destinados ao uso humano são excretados na urina como composto original ou metabolitos.

A principal fonte de entrada dos fármacos no compartimento hídrico dá-se através das estações de tratamento de águas residuais (ETAR), pois esta fonte reúne resíduos de fármacos que entram na rede de esgotos municipais e hospitalares [27]. Assim, os fármacos são relativamente abundantes em efluentes de ETAR e lixo doméstico, mas resultam igualmente de atividades veterinárias, da agricultura e da aquacultura [28]. Desta forma, e apesar de parecer paradoxal, as ETAR contribuem decisivamente para a problemática dos fármacos no ambiente. A complexidade química destas substâncias faz com que não sejam totalmente removidas pelos processos de tratamento convencionais das ETAR, variando de fármaco para fármaco, entre os 0 a 90% [29]. Segundo Boxall *et al.* [30], existem diversas razões que podem afetar de forma significativa a taxa de remoção dos fármacos nas ETAR; aqui incluem-se fatores como a fotossensibilidade, biodegradabilidade, lipofilicidade, volatilidade e solubilidade na água.

A utilização de fármacos, muitas vezes de forma indiscriminada e intensiva, faz com que estes apareçam em grandes quantidades no ambiente aquático, interferindo de forma significativa na fisiologia e no metabolismo dos organismos expostos [22,31]. Além disso, vários autores sugerem que os fármacos podem, também, causar efeitos tóxicos sinérgicos, indicando, portanto, que são potencialmente prejudiciais, ambientalmente perigosos e podem afetar a integridade dos ecossistemas aquáticos [7,12,31].

Os AINEs fazem parte do grupo de produtos farmacêuticos mais detetados em ETAR; por exemplo, em efluentes das ETAR do Reino Unido, as concentrações médias de diclofenac (DFC), ibuprofeno (IBP) e ácido mefenâmico (AMF) foram de 0,42, 3,09 e 0,13 µg/L, respetivamente [4, 32]. Usualmente, a concentração do

DCF encontrado no ambiente aquático é de 2 µg/L [11,33,34]. No entanto, em alguns rios do Paquistão registaram-se concentrações mais elevadas deste anti-inflamatório, com cerca de 4900 ng/L [35]. Na Alemanha, também é bastante comum a presença de fármacos em ETAR, bem como em rios. Concentrações médias de ácido acetilsalicílico (AAS), DCF, IBP e naproxeno (NAP) foram de 0,22, 0,81, 0,37 e 0,30 µg/L, respetivamente. Outro estudo demonstrou que as concentrações dos mesmos compostos em outros cursos de água atingiram os níveis de 0,02, 0,15, 0,07 e 0,07 µg/L, respetivamente [4]. Na Coreia do Sul, concentrações de AAS, DCF, IBF e AMF e NAP superiores a 0,27, 0,74, 3,53, 1,39 e 0,33, respetivamente, foram reportadas em rios [4].

No estudo desenvolvido em 1976 [36] foi detetada a presença do principal metabolito de muitos fármacos antilipídicos, o ácido clofíbrico, e, a partir daí, muitos outros estudos para deteção de fármacos no ambiente foram desenvolvidos [37-40]. Nesses estudos, foi determinada a ocorrência de 70 contaminantes em águas residuais na região dos Balcãs Ocidentais (Croácia, Bósnia-Herzegovina, Sérvia) e os resultados demonstraram que os compostos individuais mais abundantes pertenciam às classes de produtos farmacêuticos, incluindo os AINEs. Estudos sobre a taxa de ocorrência e remoção de sete produtos farmacêuticos, incluindo o (DCF), em afluentes e efluentes de uma ETAR na Suécia foram realizados. Para além desses países, na Índia, duas cidades (Ghaziabad e Lucknow) também foram áreas alvo de estudo da presença de produtos farmacêuticos em águas residuais. Os resultados demonstraram existir seis produtos farmacêuticos de diferentes classes, incluindo AINEs. Sui *et al.* [40] analisaram a ocorrência de produtos farmacêuticos frequentemente detetados em águas subterrâneas e os resultados obtidos demonstraram que, mais uma vez, os AINEs estão incluídos.

O DCF (Fig.1), devido à sua ampla utilização, é também um dos AINEs mais frequentemente detetado em efluentes de ETAR e águas superficiais, na gama dos µg/ [41,42]. Segundo Zhang *et al.* [43], por ano e em todo mundo, o consumo de DCF é estimado em 940 toneladas, com dose diária recomendada de 100 mg. Um relatório da associação “FiercePharma”, em 2012, listou o DCF como a 12.<sup>a</sup> molécula mais vendida globalmente [9,44]. Por isso foi incluído na lista de substâncias prioritárias de acordo com a Diretiva 2013/39/EU [45].

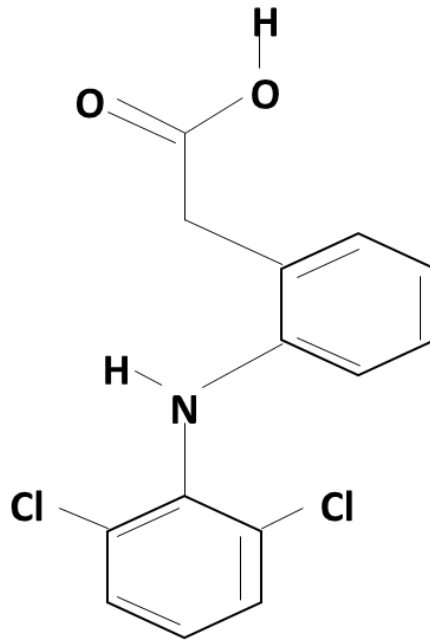


Fig. 1 – Estrutura química do diclofenac. Fonte: [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) (2017).

## 1.2. Atividade farmacológica e toxicológica do DCF

As atividades terapêuticas dos AINEs decorrem da inibição de uma ou de ambas as formas de cicloxigenase (COX 1 e 2), que são responsáveis pela biossíntese das prostaglandinas [46], que desempenham um papel fundamental em diversas funções metabólicas, em processos fisiológicos e patológicos, nomeadamente na vasodilatação, vasoconstrição, hipotensão, ovulação, aumento do fluxo sanguíneo, proteção da mucosa gástrica, inibição da agregação plaquetária, regulação da quimiotaxia, entre outros [47]. Esta ação dos AINEs sobre as isoenzimas da cicloxigenase (COX) reduz, conseqüentemente, a biossíntese das prostaglandinas, diminuindo, então, a intensidade dos processos inflamatórios [48]. Pensa-se, também, que alguns dos efeitos adversos causados por esta classe terapêutica, como a nefropatia (no caso de DCF), estejam diretamente relacionados com esta inibição [49]. São geralmente classificados pelas suas estruturas químicas em salicilatos, oxicanos, sulfonanilidas, derivados

de ácido (propiónico, acético e fenâmico) e inibidores seletivos da COX-2 (*coxibs*) [5].

O diclofenac (ácido 2-[2-[(2,6-diclorofenil) amino] fenil] acético; DCF) é um dos AINEs mais prescrito e utilizado. Conhecido pelo seu perfil de eficácia, é geralmente utilizado como analgésico para reduzir a dor e melhorar condições inflamatórias, como artrite reumatoide, osteoartrite, dismenorreia e espondilite [39, 50-52]. É empregado em várias formas farmacêuticas, como comprimidos, cápsulas, supositórios, soluções intravenosas, pomadas e géis [53]. Assim como outros AINEs, o DCF atua inibindo de forma reversível ou irreversível uma ou ambas as isoformas das enzimas de cicloxigenase (COX1 e COX2) envolvidas na síntese de diferentes prostaglandinas a partir do ácido araquidônico [54].

O uso do DCF está geralmente associado a efeitos adversos, como alterações cardiovasculares, gastrointestinais e complicações hepáticas [55]. No entanto, este anti-inflamatório é caracterizado principalmente por causar hepatotoxicidade, rara, mas potencialmente séria [56], sendo comum associar o seu uso à ocorrência de hepatotoxicidade idiossincrática, segundo vários estudos publicados [57]. O metabolismo do DCF nos seres humanos e animais ocorre pela sua bioativação por ação do citocromo p-450 (CYP450), através da sua degradação em derivados hidroxilados, incluindo 4'-hidroxiclofenac, 5-hidroxiclofenac, 3'-hidroxiclofenac e 4'5'-dihidroxiclofenac [35, 58, 59].

Embora os inibidores do CYP450 diminuam claramente a toxicidade do DCF, a sua toxicidade e papel dos seus metabolitos ainda não são bem compreendidos e acredita-se que os metabolismos hepáticos do DCF podem desempenhar um papel importante na formação de metabolitos reativos. Geralmente, é aceite que 2 metabolitos hidroxilados, nomeadamente 4'-hidroxiclofenac e 5-hidroxiclofenac, estejam envolvidos na formação de metabolitos reativos que foram associados à hepatotoxicidade idiossincrática do DCF [60]. Na maioria dos casos, é observada necrose centrilobular (zona 3 do fígado), onde existe maior quantidade CYP450, e, além disso, têm sido relatados casos de hepatite crónica, parecida com hepatite autoimune [56,57].

### 1.3. Diclofenac (DCF): ecotoxicologia e presença no ambiente aquático

A toxicidade do DCF foi já relatada em várias espécies aquáticas; no entanto, as informações acerca dos seus efeitos resultantes de exposição a longo prazo são limitadas [61]. O estudo conduzido por Ferrari *et al.* [62] foi um dos primeiros a demonstrar a toxicidade do DCF. Nesse estudo, foram avaliadas as concentrações a que causariam 50% do efeito (EC50), concentração sem efeito observado (NOEC) e concentração mais baixa com efeito observado (LOEC), através de ensaios toxicológicos agudos (em várias bactérias, ex.: *Vibrio fischeri*) e crônicos (em algas, ex.: *Pseudokirchneriella subcapitata*; rotíferos, ex.: *Brachionus calyciflorus*; crustáceos, ex.: *Cerodaphnia dubia*; e peixes, ex.: *Danio rerio*). Os resultados desse trabalho concluíram que havia efeitos tóxicos relativamente baixos mesmo em concentrações ambientais.

Daí em diante, começaram a surgir mais evidências de que exposições prolongadas a concentrações ambientais de DCF são capazes de levar a consequências prejudiciais na saúde geral dos peixes, incluindo alterações histológicas e imunológicas, como, por exemplo, em trutas da espécie *Salmo trutta fario* após exposição durante 21 dias a diferentes concentrações (0,5, 5 e 50 µg/L) de DCF [63]. Num trabalho distinto, com outra espécie de truta (truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss*), foi, também, demonstrada a ocorrência de alterações histológicas e da expressão génica depois de exposições crônicas de 21 dias às concentrações de 0,5, 1, 5, e 25 µg/L do fármaco [64]. Efeitos na expressão genética no fígado desta mesma espécie de truta foram observados em concentrações de DCF abaixo de 1,6 µg/L, após 15 dias de exposições [65]. Estudos de curto (96 horas) e longo prazo (35 dias) com peixes da espécie *Cirrhinus mrigala* demonstraram alterações significativas em parâmetros bioquímicos, hematológicos, ionoregulatórios e enzimáticos para todas as concentrações do DCF (1, 10 e 100 µg/L) [66]. Respostas ao stress oxidativo foram, também, observadas em peixe zebra (*D. rerio*) após exposições de 7 dias não só ao DCF, mas também aos seus subprodutos de fotólise (ex.: 2- (8-hidroxi3-oxo3H-carbazol1-il) ácido acético e 8-hidroxi3-oxo9,9a-di-hidro3H-

carbazolil) acético) à concentração de 1 mg/L [67]. Os resultados sugeriram aumento da atividade das enzimas glutathione-s-transferase (GST) e catalase (CAT) [29]. Outros efeitos reportados do DCF incluem alteração no comportamento alimentar da espécie de peixe *Oryzias latipes* expostos a 1 mg/L durante 9 dias [68].

Os efeitos do DCF não se limitam aos peixes. Mexilhões da espécie *Mytilus spp.* foram expostos por injeção a concentrações ambientais e elevadas (1 µg/L e 1000 µg/L) de DCF e, após 96 horas de exposição, foram evidenciados danos nos tecidos, com aumento significativo da peroxidação lipídica (LPO) [69]. Em mexilhões da espécie *Mytilus galloprovincialis* expostos a uma concentração nominal ambientalmente relevante de DCF (250 ng/L) ao longo de 15 dias, foi observada uma indução substancial das atividades das enzimas glutathione redutase (GR) e superóxido dismutase (SOD) nas brânquias, tendo causado também um aumento da LPO na glândula digestiva e alterações na atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) [70].

Alguns crustáceos parecem ser, também, sensíveis a essa substância. Indivíduos da espécie *Daphnia magna* expostos de forma aguda a concentrações de DCF (0,0005, 0,5 e 7,2 mg/L) por um período de 48 horas evidenciaram inibição da atividade da enzima AChE e glutathione peroxidase total (GPx) [15].

Além dos organismos mencionados anteriormente, os efeitos tóxicos do DCF foram, também, já reportados em estudos com a planta aquática da espécie *Lemna minor*. Efeitos do DCF incluíram, principalmente, aumento da LPO e redução das atividades oxidoreductase e desidrogenase, após exposição de 10 dias nas concentrações de 0,1 e 10 µg/L [71].

## 1.4. Possibilidade de contaminação ao longo da cadeia trófica

Um dos critérios para avaliar a bioacumulação de um composto é através do coeficiente partição octanol/água ( $P_{OH}$ ). Os  $P_{OH}$  são características importantes para estudar o comportamento químico dos compostos orgânicos, pois refletem a lipofilicidade e a hidrofiliicidade de um composto e a forma como se distribuem termodinamicamente, ou seja, partições em fases aquosas e orgânicas [72].

O DCF é conhecido por causar efeitos em organismos não-alvo, como peixes, nos quais pode bioacumular e alterar reações celulares em vários órgãos, entre eles, fígado, rins e brânquias [9, 64]. Esta tendência deriva do facto de possuir um  $P_{OH}$  de 4,51, que está bem acima do valor estabelecido pela OECD ( $P_{OH} > 3$ ) como um dos principais critérios que favorecem a bioacumulação de um composto [73]. Nesse sentido, estudos prévios com DCF evidenciaram, após análise do músculo de trutas expostas a 1  $\mu\text{g/L}$  de DCF, a presença de resíduos deste tóxico na taxa de  $72,8 \pm 23,3$  ng/g [9]. Portanto, isto demonstra uma certa preocupação relativamente ao seu elevado potencial de bioacumulação e potencial subsequente para intoxicação secundária dentro da cadeia alimentar aquática, reforçando a ideia de que, mesmo em concentrações baixas, o DCF pode representar um eventual risco para o ambiente [74].

## 1.5. Acetilcolinesterase (AChE)

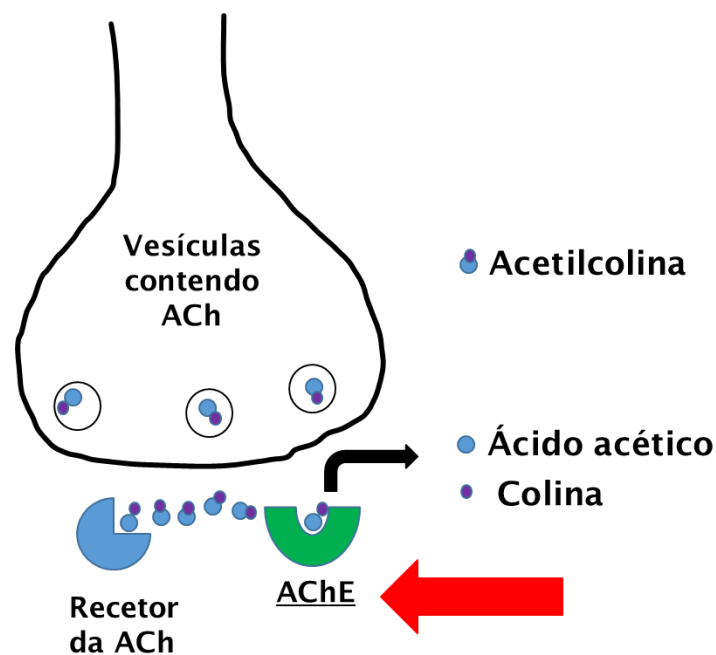
De forma a avaliar os danos induzidos por estes contaminantes emergentes em organismos aquáticos e avaliar a qualidade do habitat, são utilizados biomarcadores, que podem ser definidos como quaisquer alterações bioquímicas, fisiológicas ou morfológicas mensuráveis, agregadas à exposição a um agente tóxico [17, 75-77].

O termo biomarcador pode ser dividido em três classes: **biomarcador de exposição** — engloba a deteção e quantificação de um composto exógeno, dos seus metabolitos e interação entre este e moléculas ou células alvo, sendo medidos num compartimento do organismo; **biomarcador de efeito** — compreende alterações fisiológicas ou bioquímicas, que podem ser quantificadas nos tecidos ou fluidos corporais, que estão possivelmente associados a este desequilíbrio no organismo; e **biomarcador de suscetibilidade** — refere-se à capacidade específica ou adquirida de um organismo alterar a vulnerabilidade a uma exposição, incluindo fatores genéticos [17, 78].

Em 1992 o autor Peakall [79] definiu uma divisão em biomarcadores, seguindo uma perspetiva fisiológica, entre os quais está incluída uma divisão de biomarcadores de neurotoxicidade (atividade de acetilcolinesterase). Segundo Xuereb *et al.* [80], a colinesterase ChE é o principal neurotransmissor nos sistemas sensoriais e neuromusculares na maioria das espécies animais. As ChEs pertencem à família de enzimas designadas como esterases, com a capacidade de hidrólise de ésteres carboxílicos. Comparativamente às outras esterases, as ChEs apresentam preferência pela hidrólise de ésteres de colina e são inibidas pela fisostigmina em concentrações na faixa de  $10^{-5}$  M [81]. Nos vertebrados, a classe das ChEs inclui acetilcolinesterase ou colinesterase verdadeira (AChE), e butirilcolinesterase ou pseudocolinesterase (BChE), que diferem na sua especificidade de preferência por substrato e efeitos de inibidores [82,83]. Também designada de colinesterase específica, a AChE (AChE, EC 3.1.1.7) (Fig.2) é uma enzima-chave do sistema nervoso, cuja principal função é catalisar a hidrólise da acetilcolina em colina e ácido acético em locais sinápticos colinérgicos [82-84]. A inibição da atividade da AChE leva à acumulação da

acetilcolina nas sinapses nervosas, levando à toxicidade aguda causada pelo excesso de estimulação nas membranas pós-sinápticas, resultando na morte de organismos expostos [12-84].

Vários estudos têm utilizado a inibição das colinesterases (ChEs) como biomarcador para monitorização de contaminação ambiental de vários compostos, incluindo, principalmente, os pesticidas organofosforados (OP) e carbamatos (CB) [82,85-87]. O uso da inibição da AChE assume, assim, um papel distintivo no que se refere a informações fornecidas para estudos de ecotoxicologia, pois a sua inibição pode ocorrer pela exposição de várias espécies de contaminantes ambientais distintos, além de pesticidas OP e CB [81].



**Fig. 2** - Ação da enzima acetilcolinesterase (AChE) na hidrólise da acetilcolina em colina e ácido acético. (Adaptado de 78).

## 1.6. Poliquetas como organismos-teste em ecotoxicologia

Os poliquetas têm sido utilizados como organismos-teste em (eco)toxicologia para monitorização de poluição, análise de contaminantes e saúde das comunidades bentónicas [88]. As espécies de poliquetas *Capitella capitata*, por exemplo, foram utilizadas pela primeira vez em testes toxicológicos num trabalho de Reish e Bernard [89] e, a partir daí, várias outras espécies têm sido objeto de estudo. Os poliquetas desempenham funções essenciais ao funcionamento do ecossistema marinho; são responsáveis ativos pela bioturbação, pela reciclagem e transporte de oxigénio e material dissolvido nos sedimentos [90].

Em vários países, inclusive na zona sudoeste de Portugal, estes invertebrados são utilizados como alimentos vivos na aquacultura ou como isco para pesca recreativa ou profissional, tornando-os, assim, animais com grande importância comercial [91,92]. São facilmente capturados e mantidos em laboratório, o que justifica o seu uso como modelo biológico para estudos experimentais desde a década de 1950 [93,94].

Na maioria das espécies de poliquetas, o ciclo de vida tem uma duração de dias ou semanas e as taxas de reprodução são elevadas [88]. Toda a família Nereididae caracteriza-se por um padrão de reprodução denominada de monotélica, o que significa que existe apenas um único evento reprodutivo. São gonocóricos e, durante o processo de maturação sexual, os machos adultos possuem cores diferentes das fêmeas adultas. Enquanto os machos apresentam uma cor verde-grama brilhante, as fêmeas por outro lado, têm uma cor verde muito escura. Relativamente aos indivíduos imaturos, estes assumem uma cor castanha avermelhada [94].

A alta taxa de reprodução destes indivíduos faz com que qualquer alteração nos habitats onde vivem, nomeadamente por entrada de poluentes e/ou matéria orgânica, desencadeie uma resposta rápida nestes ecossistemas. Alterações a longo prazo podem suceder-se devido à imobilidade dos indivíduos adultos dentro dos sedimentos, o que proporciona exposição crónica a qualquer contaminante ambiental e, de igual forma, refletir-se nas populações [95].

Os poliquetas da espécie *Hediste diversicolor* (O.F. Muller, 1776) (Fig.3), pertencem à família Nereididae e à ordem Phyllodocida [94]. Segundo Fonseca e Costa [96], a família Nereididae representa uma das famílias de poliquetas mais exploradas devido à sua abundância e facilidade de manuseio, sendo distribuídos amplamente pelos estuários e habitats lagunares do Norte de África ao Norte da Europa [91]. A versatilidade dos indivíduos desta espécie é justificada pela grande tolerância fisiológica a variações extremas dos fatores ambientais (salinidade e temperatura) [94]. Além disso, estes organismos têm a capacidade de crescer e reproduzir-se em diferentes tipos de sedimentos e em ambientes com altos níveis de stress, e sobreviver a condições drásticas de hipoxia [94].



**Fig. 3** - Poliqueta *Hediste diversicolor* (foto do autor)

## 1.7. Peixes pleuronectiformes

Por serem encontrados em praticamente todos os ecossistemas aquáticos e pelo facto de desempenharem um papel ecológico bastante relevante nas redes alimentares aquáticas, os peixes têm despertado grande interesse no que se refere a estudos (eco) toxicológicos [17]. Além disso, os peixes apresentam maior sensibilidade a uma vasta gama de poluentes, comparativamente aos invertebrados, e são organismos-teste convenientes para avaliação da qualidade da água [97].

O peixe *Solea senegalensis* (Kaup 1858) pertence à ordem dos Pleuronectiforme, à família Soleidae e ao género Solea. Esta espécie marina bentónica caracteriza-se por ser pouco ativa, demersal, com corpo oval, com mecanismos de mimetismo e é classificada como um bom organismo-teste para avaliar a exposição aos xenobióticos [98-100].

Na fase adulta, geralmente os indivíduos desta espécie vivem em fundos arenosos ou lamacentos de áreas costeiras entre os 80 a 100 metros de profundidade [101]. É uma espécie gonocórica, ovípara com fertilização externa, sendo a sua época de reprodução bastante variável, podendo ser de janeiro a junho e de outubro a novembro [102,103]. A época de postura desta espécie estende-se por um período de quatro meses (março a junho), sendo a emissão máxima de ovos em maio. A maturidade é atingida aos três anos de idade, com um comprimento de aproximadamente 32 cm [104,105].

O linguado *S. senegalensis* (Fig.4 A) está adaptado a águas subtropicais e temperadas e a ambientes de salinidade elevada (30 a 35), distribuindo-se nas águas do Oceano Atlântico, do Senegal à França (La Rochelle), sendo também encontrado em toda a costa continental portuguesa, e considerado uma espécie invasora do mar Mediterrâneo (Fig.4 B) [103].

Durante 15 a 20 dias, as larvas do *S. senegalensis* são planctónicas e pelágicas e tornam-se, depois, bentónicas durante a metamorfose [106]. Os adultos alimentam-se de pequenos invertebrados bentónicos, como poliquetas (principalmente da espécie *H. diversicolor*) e pequenos crustáceos (i.e., anfípodes), enquanto as pós-larvas e os juvenis se alimentam de pequenos crustáceos, exclusivamente copépodes, mas também de poliquetas [101,102]. Os

indivíduos de *S. senegalensis* possuem um elevado potencial económico e comercial não só na aquacultura, em que são vulgarmente produzidos em Portugal e em Espanha (para consumo humano), mas também na pesca [97,107,108].



**Fig. 4** - *Solea Senegalensis* (A) (foto do autor), B. distribuição geográfica do linguado Fonte: [www.aquamaps.org](http://www.aquamaps.org) (2017).

## 1.8. Objetivos

Os principais objetivos do presente trabalho foram:

- Determinar os efeitos toxicológicos em duas espécies marinhas resultantes da exposição a um fármaco comumente utilizado, o diclofenac, em termos de neurotoxicidade, por intermédio da quantificação da atividade da enzima AChE;
- Verificar se há transferência de contaminantes específicos, nomeadamente o diclofenac, ao longo de uma cadeia trófica simulada;
- Avaliar os efeitos dessa transferência de resíduo deste fármaco por via trófica na espécie de peixe.

## 2. Materiais e métodos

### 2.1. Substância-teste

O composto utilizado neste trabalho foi o diclofenac ( $C_{14}H_{10}Cl_2N_2O_2$ , CAS:15307-79-6, com um grau de pureza de 98.0%), adquirido à empresa Sigma Aldrich. Uma solução-mãe foi preparada para a realização das exposições, através da diluição do fármaco em água destilada (10 mg/L). Após a preparação, esta solução foi acondicionada em frasco envolvido em papel de alumínio, de forma a evitar contato com a luz e conseqüente degradação da substância, e armazenada no frigorífico.

### 2.2. Organismos-teste

#### 2.2.1. *Hediste diversicolor*

Os indivíduos da espécie *H. diversicolor* (poliquetas) foram capturados à mão com recurso a um gadanho durante a maré vazante no estuário de Rio Douro, na Baía de São Paio (41° 08' 22"N, 8° 39' 38"W), Vila Nova de Gaia. Todos os indivíduos foram capturados entre os meses de janeiro e abril de 2017. O Rio Douro foi escolhido como local de captura dos poliquetas porque, num estudo em estuários do nordeste de Portugal, o estuário do Douro apresentou menor nível de contaminação comparativamente aos estuários dos rios Lima e Minho [109]. O estuário do Rio Douro é um dos mais importantes estuários de Portugal. O Rio Douro é um dos rios mais longos da Península Ibérica, com cerca de 930 km. Além disso, partilha os seus 98 000 km<sup>2</sup> de bacia hidrográfica entre Portugal e Espanha [109,110]. Este estuário é bastante utilizado em vários estudos como local de referência e possui temperaturas que variam entre os 8 e os 25°C e, salinidade de 0 a 35 [87,111].

Após a captura, os indivíduos foram transportados em baldes até à chegada ao laboratório. No laboratório, estes foram colocados em caixas com sedimento (200 indivíduos/m<sup>2</sup>), água do mar com salinidade de 21, adequada para a

manutenção dos animais [112] e arejamento contínuo. O sedimento utilizado foi recolhido no mesmo estuário que os organismos e antes de ser utilizado foi lavado com água destilada e colocado a secar.

Os animais foram mantidos durante duas semanas em quarentena/depuração antes do ensaio com um fotoperíodo de 12L:12O. Durante esta fase, os indivíduos foram alimentados com ActivPet® (ração para peixe), de 48 em 48 horas, e durante as duas primeiras semanas o meio foi renovado uma vez.

### **2.2.1.1. Exposição crónica de *H. diversicolor***

Realizou-se um ensaio de 28 dias com indivíduos de *H. diversicolor*. As concentrações foram estabelecidas de acordo com estudos prévios e em função de critérios de relevância ecológica, simulando as condições que realmente ocorrem no ambiente. As concentrações do DCF selecionadas para este estudo foram 0,5, 1 e 2 µg/L. Estas concentrações foram selecionadas porque representam as concentrações do fármaco mais frequentemente detetadas no compartimento aquático, de acordo com os valores encontrados na literatura [9,11,52].

Durante o ensaio, foram utilizados quatro tratamentos (15 indivíduos por tratamento) e três réplicas: o controlo (indivíduos não expostos ao tóxico) e mais três tratamentos, com concentrações baixa (0,5 µg/L), média (1 µg/L) e alta (2 µg/L). A renovação de 80% do meio foi feita de 48 em 48 horas e os animais foram alimentados com ração para peixes ActivPet® com a mesma frequência.

Os animais foram expostos em garrafões de cinco litros, previamente lavados com água destilada e secos. Cada garrafão continha um litro de sedimento, previamente lavado com água destilada e seco, dois litros de água do mar, com salinidade 21. No total, foram utilizados 12 garrafões e 60 indivíduos. Para preservar a integridade química da substância-teste, que é fotodegradável [34], o ensaio decorreu ao abrigo da luz (Fig. 5).

Durante o ensaio, os parâmetros físico-químicos da água, como a concentração do oxigénio (10,8±0,3; 9,4±0,4; 9,8±0,2 e 9,8±0,1 mg/L para 0,

0,5, 1 e 2 µg/L, respetivamente), o pH ( $8,3\pm 0,2$ ;  $8,3\pm 0,1$ ;  $8,4\pm 0,1$ ; e  $8,4\pm 0,1$  para 0, 0,5, 1 e 2 µg/L) e a temperatura ( $15,4\pm 0,3$ ;  $15,2\pm 0,0$ ;  $15,2\pm 0,1$  e  $15,2\pm 0,1$ °C para 0, 0,5, 1 e 2 µg/L, respetivamente) foram avaliados com uma sonda multiparamétrica portátil (YSI, 556 MPS), um dia após a mudança do meio.

Após a exposição, os animais foram sacrificados e porções destes foram selecionadas, acondicionados em microtubos de Eppendorf, devidamente identificados, para quantificar a atividade da AChE.

Antes do acondicionamento final (a -80°C), as amostras foram colocadas em contato com nitrogénio líquido (-196°C), de forma a preservar a integridade do material biológico.



Fig. 5 - Exposição crónica de *H. diversicolor* (foto do autor).

### 2.2.1.2. Ensaio de contaminação dos indivíduos de *H. diversicolor*

Este processo de contaminação foi realizado durante 28 dias, com os mesmos números de tratamento efetuados no ensaio crónico. Os animais foram expostos em caixas com capacidades para aproximadamente 50 litros (40 cm de altura e largura e 60 cm de comprimento), devidamente desinfetadas e lavadas com abundante água destilada, com 15 cm de altura de sedimento proveniente do estuário do Rio Douro, onde estes indivíduos foram capturados, e 30 litros de água salgada (21) (Fig. 6). Os sedimentos foram previamente lavados com água destilada e secos.



**Fig. 6** – Sistema utilizado para o ensaio de contaminação dos poliquetas (foto do autor).

Para este efeito, cada tratamento constou da exposição de cerca de 300 g, numa densidade de aproximadamente 1200 indivíduos/m<sup>2</sup> de *H. diversicolor*: controlo (indivíduos não expostos ao tóxico), concentração baixa (0,5 µg/L), concentração média (1,0 µg/L) e concentração alta (2,0 µg/L). À semelhança do ensaio crónico, a exposição ocorreu ao abrigo da luz.

De forma a assegurar o bem-estar dos animais durante a contaminação e prevenir/diminuir a taxa de mortalidade, os parâmetros físico-químicos da água, como a concentração de oxigénio (9,1±0,3; 9,4±0,2; 9,3±0,3 e 9,4±0,2 mg/L para 0, 0,5, 1 e 2 µg/L, respetivamente), o pH (8,6±0,3; 8,7±0,4; 8,6±0,2 e 8,5±0,2 para 0, 0,5, 1 e 2 µg/L, respetivamente) e a temperatura (15,4±0,0; 15,1±0,6; 15,8±0,1 e 15,4±0,6°C para 0, 0,5, 1 e 2 µg/L, respetivamente) foram avaliados com uma sonda multiparamétrica portátil (YSI, 556 MPS). A renovação de 80% do meio foi feita de 48 em 48 horas. A alimentação dos animais foi feita com a mesma ração utilizada na quarentena e no ensaio crónico e com a mesma frequência, ou seja, a cada muda do meio. Após a contaminação dos indivíduos de *H. diversicolor*, procedeu-se ao congelamento a -20°C dos animais de cada tratamento, separadamente, em sacos individuais. Em cada saco, foi acondicionada aproximadamente uma quantidade de cinco gramas de poliquetas.

## 2.2.2. Exposição do peixe *S. senegalensis*

Adultos de espécie *S. senegalensis* (comprimento total  $15\pm 10$  cm; peso total  $100\pm 60$  g) foram adquiridos a uma instalação de aquacultura comercial (Aquacria Piscícolas S.A), na Torreira, Aveiro. Após a aquisição, estes foram transportados para o laboratório, em sacos de plásticos refrigerados, com uma atmosfera de oxigénio a 100%. À chegada, os animais foram transferidos para um tanque com 2 200 litros de água salgada (21), mantidos sob regime de fotoperíodo natural à temperatura de 18 a 22°C e com arejamento contínuo. Estes fatores abióticos foram mantidos durante 15 dias e, antes do início da exposição, foram selecionados apenas animais saudáveis e com calibres mais ou menos semelhantes.

As exposições dos indivíduos de *S. senegalensis* foram crónicas (28 dias) sob especificações da diretriz da OECD 215 “Fish, Juvenile Growth Test” [113]. Durante a exposição, os indivíduos foram expostos a quatro tratamentos: controlo (indivíduos não expostos ao tóxico), concentração baixa (0,5 µg/L), concentração média (1 µg/L) e concentração alta (2 µg/L). Estas concentrações de DCF foram adotadas de acordo com os critérios anteriormente referidos [11].

Para cada tratamento (incluindo o grupo de controlo) foram utilizadas três réplicas. No total, foram preparados 12 aquários (50 L), contendo cada um seis indivíduo (fig. 7). Foi utilizado um sistema de exposição semiestático, em que 80% do meio foi renovado de 48 em 48 horas. Durante a exposição, os fatores abióticos foram idênticos aos da quarentena e os indivíduos foram alimentados com *H. diversicolor* congelados, de 48 em 48 horas. Os parâmetros físico-químicos da água, como a concentração do oxigénio ( $9,1\pm 0,3$ ;  $9,4\pm 0,0$ ;  $9,4\pm 0,2$ ;  $9,1\pm 0,5$  mg/L para 0, 0,5, 1 e 2 µg/L, respetivamente), pH ( $8,5\pm 0,2$ ;  $8,6\pm 0,1$ ;  $8,6\pm 0,1$  e  $8,6\pm 0,2$  para 0, 0,5 1 e 2 µg/L, respetivamente) e temperatura ( $15,3\pm 0,3$ ;  $15,2\pm 0,2$ ;  $15,2\pm 0,3$  e  $15,7\pm 0,2$ °C para 0, 0,5, 1 e 2 µg/L, respetivamente) foram avaliados com uma sonda multiparamétrica portátil (YSI, 556 MPS), sempre no dia após a mudança do meio. Parâmetros como amónia e nitritos foram medidos com um fotómetro (YSI, 9300) com pastilhas de teste de água (Palintest, NH<sub>3</sub> e NO<sub>2</sub>). Não houve mortalidade no tratamento-controlo, fazendo com que o ensaio estivesse em harmonia com a diretriz adotada, que requer uma taxa de mortalidade, no tratamento-controlo, de menos de 10% dos organismos expostos.



**Fig. 7** – Exposição crónica de *S. senegalensis* (foto do autor).

Após o período de exposição, os organismos foram anestesiados por arrefecimento rápido num balde contendo quantidades aproximadas de água e gelo ( $a \leq 4^{\circ}\text{C}$ ), até estes perderem a capacidade de nadar, o reflexo de endireitamento e movimentos operculares. Este método mostrou ser rápido, eficaz e pouco stressante para os organismos [114].

Posteriormente, os animais foram decapitados por secção da espinal medula e tecidos dos cérebros foram utilizados para a determinação da atividade da enzima AChE. O material biológico foi colocado em microtubos de Eppendorf devidamente identificados e preservados em nitrogénio líquido ( $-196^{\circ}\text{C}$ ), de forma a impedir a perda da atividade das enzimas. No final, as amostras foram armazenadas em arca de  $-80^{\circ}\text{C}$ , até serem analisadas.

## 2.2.2.2. Ensaio de transferência do tóxico na cadeia trófica

Este último ensaio teve por objetivo verificar se há transferência do DCF ao longo da cadeia trófica e os efeitos daí resultantes. À semelhança da exposição crónica com os linguados de espécie *S. senegalenses*, esta foi realizada durante 28 dias sob especificações da diretriz da OECD 215 “Fish, Juvenile Growth Test” [113]. Foram utilizados quatro tratamentos: o controlo (peixes alimentados com indivíduos de *H. diversicolor* não expostos ao DCF), tratamento de concentração baixa (peixes alimentados com indivíduos de *H. diversicolor* previamente expostos à concentração baixa do DCF), tratamento de concentração média (peixes alimentados com indivíduos de *H. diversicolor* previamente expostos à concentração média do DCF) e tratamento de concentração alta (peixes alimentados com indivíduos de *H. diversicolor* previamente expostos à concentração alta do DCF). Foram definidas três réplicas de cada tratamento e a alimentação dos linguados foi feita de 48 em 48 horas.

O sistema utilizado durante a exposição foi o semiestático, com renovações parciais de meio (80%), constituído por água salgada com salinidade a 21, em aquários com capacidade para 50 L.

A quantidade de alimento utilizada para cada aquário foi de aproximadamente 2,5 g de poliquetas contaminadas (não contaminadas para o controlo), que equivalem a 0,5% da massa corporal dos linguados. No nosso estudo foi adotado este valor intermediário aos valores encontrados na literatura (1 e 1,2%), pois esse valor minimizava a presença de compostos azotados presentes na água; além disso, valores acima dos estipulados favoreciam o crescimento dos organismos, o que não era pretendido [115].

Os fatores abióticos também foram determinados ao longo da exposição, como a concentração de oxigénio (9,3±0,3; 9,4±0,1; 9,4±0,2; 9,0±0,2 mg/L para 0, 0,5, 1 e 2 µg/L, respetivamente), pH (9,1±0,2; 9,2±0,1; 9,1±0,1; 9,1±0,2 para 0, 0,5, 1 e 2 µg/L, respetivamente) e temperatura (16,3±0,3; 16,2±0,2; 16,2±0,3; 17,0±0,2°C para 0, 0,5, 1 e 2 µg/L, respetivamente) e avaliados com uma sonda multiparamétrica portátil (YSI, 556 MPS), após a respetiva mudança do meio. Parâmetros como amónia (1,3±0,03; 1,8±0,02; 2,0±0,01 e 1,7±0,02 mg/L para 0, 0,5, 1 e 2 µg/L, respetivamente) e nitritos (0,1±0,02; 0,3±0,03; 0,4±0,02 e

0,3±0,02 mg/L para 0, 0,5, 1 e 2 µg/L, respetivamente) foram medidos com um fotómetro (YSI, 9300 Photometer) com pastilhas de teste de água (Palintest, NH<sub>3</sub> e NO<sub>2</sub>). Depois do período de exposição, procedeu-se ao sacrifício dos animais, que foram previamente anestesiados com gelo a 4°C e decapitados por secção da espinal medula. Para a determinação da atividade da AChE, tecidos do cérebro dos animais foram amostrados, posteriormente colocados em microtubos de Eppendorf, devidamente identificados e, antes do armazenamento final, a -80°C, foram preservados em nitrogénio líquido (-196°C).

## 2.3. Quantificação da atividade da AChE

Para quantificar a atividade da AChE foi utilizado o método de Ellman *et al.* [116] adaptado à microplaca que se baseia na medição da taxa de degradação da acetilcolina (substrato) pela ação da acetilcolinesterase, originando acetato e tiocolina; este último produto complexa-se com o ditiobisnitrobenzoato, dando origem a um composto de cor amarela, o qual pode ser quantificado a 412 nm. A atividade desta enzima foi expressa em termos de proteína solúvel total presente nas amostras. A concentração de proteínas totais nas amostras foi determinada de acordo com o método de Bradford [117] adaptada à microplaca, de forma a expressar atividades enzimáticas em função do teor de proteína nas amostras analisadas.

Os tecidos da cabeça dos animais foram homogeneizados em tampão fosfato (0,1M, pH= 7,2) e centrifugados a 6 000 rpm durante três minutos. Os sobrenadantes resultantes da centrifugação foram utilizados para determinação enzimática.

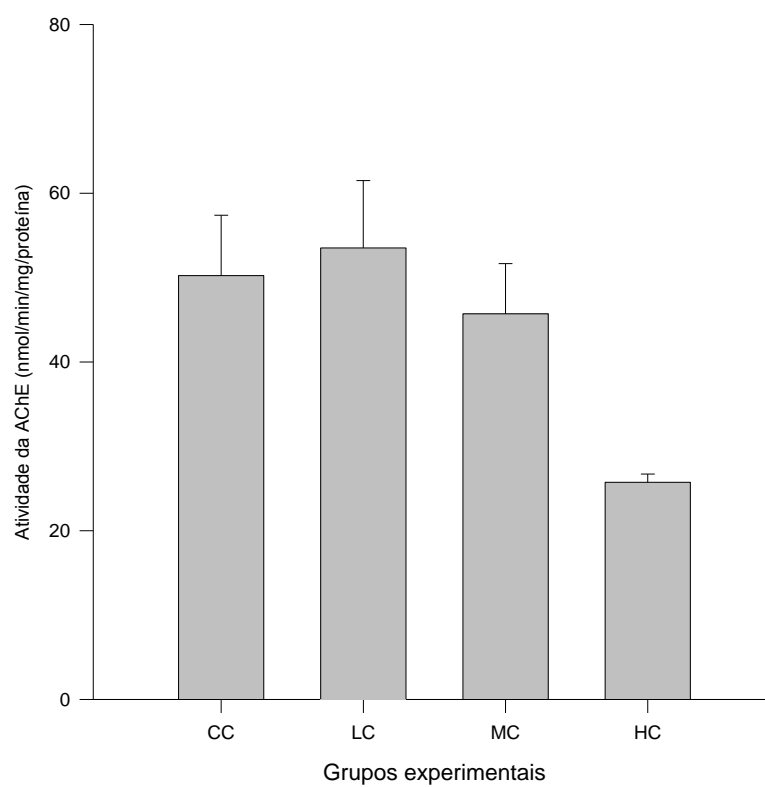
## 2.4. Análise estatística

Todas as variáveis testadas foram verificadas no sentido de se cumprirem os pressupostos de distribuição normal e homogeneidade de variâncias. Foi utilizada uma análise de variância unifatorial para testar a atividade da AChE nos animais expostos às diferentes concentrações de DCF (0,5, 1, e 2), seguida do teste de Dunnett, para avaliar as diferenças estatisticamente significativas entre as médias dos tratamentos relativamente ao tratamento-controlo. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o SigmaPlot® 11.2, usando o nível de significância de 0,05. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão.

## 3. Resultados

### 3.1. Poliquetas expostos através da água

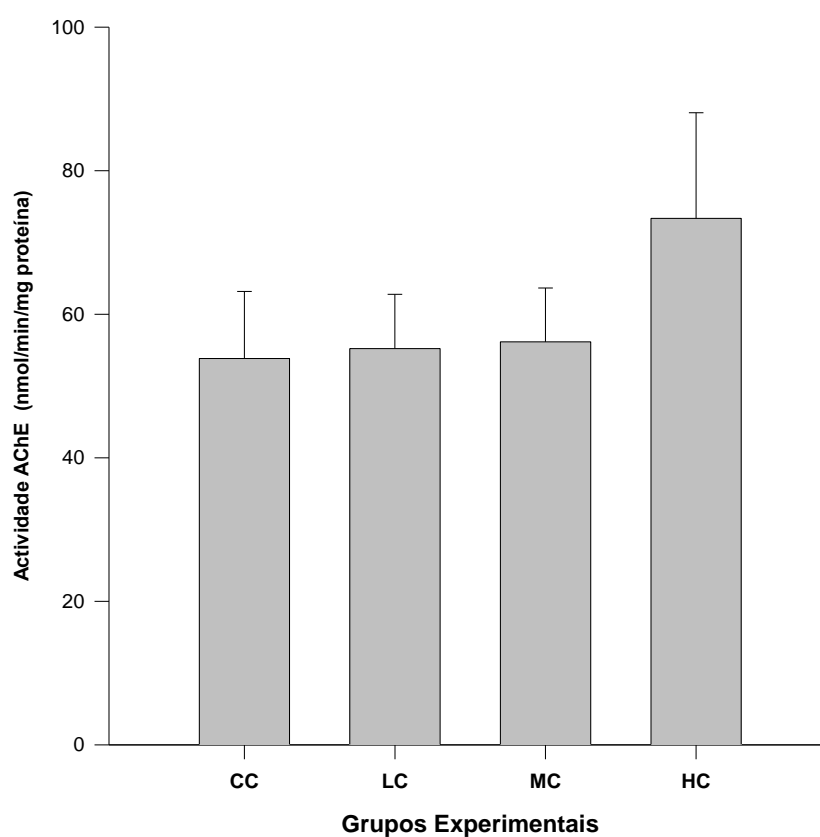
No ensaio crónico em que os indivíduos da espécie *H. diversicolor* foram expostos às diferentes concentrações do DCF (0,5, 1 e 2  $\mu\text{g/L}$ ) via água, os resultados obtidos para a atividade da AChE (Fig. 8) demonstraram a inexistência de diferenças estatisticamente significativas entre tratamentos (ANOVA unifatorial:  $F_{3,56}=0,526$ ;  $p=0,667$ ).



**Fig. 8** - Atividade da enzima AChE em indivíduos de *H. diversicolor* expostos cronicamente (28 dias) a diferentes concentrações de diclofenac. Valores correspondentes à média de três réplicas  $\pm$  erro padrão. (CC- controle; LC- concentração baixa; MC- concentração média; HC- concentração alta).

## 3.2. Peixes expostos através da água

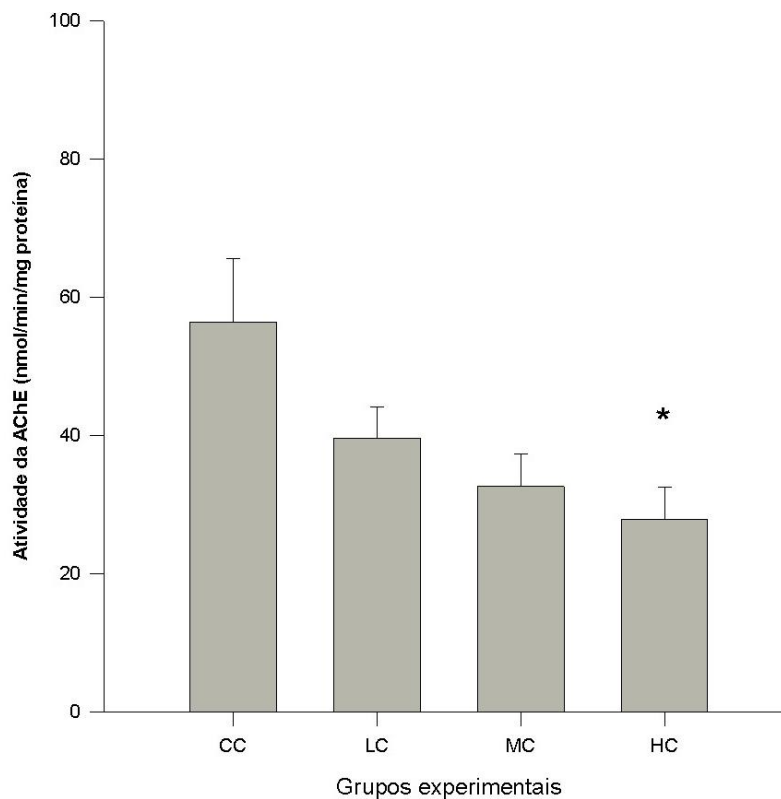
Os resultados obtidos relativamente à atividade da AChE (Fig. 9) em indivíduos de *S. senegalensis* expostos a DCF através da água demonstraram a inexistência de diferenças significativas entre os diferentes tratamentos (ANOVA unifatorial  $F_{3,56}=0,804$ ;  $p=0,498$ ).



**Fig. 9** – Atividade da enzima AChE em indivíduos de *S. senegalensis* expostos cronicamente (28 dias) a diferentes concentrações de diclofenac. Valores correspondentes à média de três réplicas  $\pm$  erro padrão. (CC- controle; LC- concentração baixa; MC- concentração média; HC- concentração alta).

### 3.3. Peixes expostos através do alimento

Os resultados obtidos, no que se refere à atividade da AChE em indivíduos de *S. senegalensis* expostos ao DCF através do alimento, demonstraram uma diminuição significativa da atividade enzimática deste biomarcador (análise de variância unifatorial  $F_{3,53}=4,154$ ;  $p=0,011$ ). Foi possível observar uma inibição significativa da atividade enzimática nos indivíduos que foram alimentados com poliquetas previamente expostas à concentração mais elevada de DCF ( $2\mu\text{g/L}$ ) (teste de Dunnett:  $p<0,05$ ) (Fig.10).



**Fig. 10** - Atividade da enzima AChE em indivíduos de *S. senegalensis* expostos cronicamente (28 dias) através do alimento. Valores correspondentes à média de três réplicas  $\pm$  erro padrão. \*- Diferenças significativas em relação ao controle,  $p<0,05$ . (CC- controle; LC- concentração baixa; MC- concentração média; HC- concentração alta).

## 4. Discussão

Os objetivos deste estudo foram avaliar os efeitos tóxicos resultantes da exposição a longo prazo e a concentrações subletais de um fármaco de uso humano, o DCF, em duas espécies marinhas, nomeadamente o poliqueta *H. diversicolor* e o peixe pleuronectiforme, *S. senegalensis*, em termos de atividade da AChE cerebral.

Conhecido como um dos AINEs mais utilizados mundialmente, cujo consumo está estimado em 940 toneladas anuais [42], o DCF é utilizado na terapêutica para aliviar dores agudas, bem como na sintomatologia associada à artrite, osteoartrite e/ou artrite reumatoide [70]. No entanto, em seres humanos, o DCF causa toxicidade crónica gástrica e renal [70,118]. Contudo, a sua toxicidade não está só documentada em seres humanos. A sua utilização para medicação de gado resultou na diminuição da população de abutres *Gyps.sp* na Índia subcontinental em 2004. Estes animais, ao alimentarem-se de gado previamente tratado com DCF, ingeriram elevadas quantidades deste fármaco e foram quase exterminados devido a falência renal [119].

Apesar das evidências acima descritas, o potencial ecotoxicológico do DCF é ainda hoje pouco conhecido. Embora em condições ambientais o DCF seja rapidamente degradado por fotólise direta, continua a ser um dos compostos mais frequentemente detetados em compartimentos aquáticos e em concentrações aproximadas de 2 µg/L [11,34,120]. Apesar de uma quantidade considerável do DCF contaminar o ambiente aquático, até à data existem poucos estudos sobre os seus efeitos crónicos [9,]. Vários organismos aquáticos já foram alvo de estudos da toxicidade do DCF, como algas, crustáceos e peixes; no entanto, estes estudos foram baseados em efeitos a curto prazo [14,62], que não são representativos da modalidade de exposição a que os organismos estão sujeitos no meio ambiente.

De forma semelhante ao que ocorre para todos os AINEs, o DCF atua através da inibição das enzimas cicloxigenase (COX1 e COX2) envolvidas na biossíntese de diferentes prostaglandinas a partir do ácido araquidónico [46]. As

prostaglandinas desempenham um papel muito importante nos invertebrados marinhos, pois regulam o transporte iônico, oogénese, espermatogénese e defesa imune [121]. Portanto, este mecanismo de ação terapêutica do DCF pode afetar estes mecanismos fisiológicos importantes, e amplamente conservados do ponto de vista evolutivo, e que regulam funções indispensáveis também em organismos não-alvo [46,121]. Resultados do estudo de Hoeger *et al.* [63] em trutas da espécie *Salmo trutta f. fario* sugerem mecanismos de ação semelhantes aos do DCF em espécies aquáticas. O DCF mostrou poder inibir a atividade da ciclooxigenase e, conseqüentemente, a síntese da prostaglandina E2 em macrófagos dos rins e das cabeças das trutas.

Efetivamente, a maioria dos efeitos adversos causados pela ação dos AINEs, pelo menos em tratamentos a longo prazo, estão relacionados com a ação fisiológica das prostaglandinas. Os danos renais causados pelo uso crônico deste grupo farmacoterapêutico parecem ser desencadeadas pela falta da manutenção de equilíbrio entre a vasoconstrição e vasodilatação no rim [21].

Os resultados obtidos no presente trabalho demonstraram que a exposição crônica de *H. diversicolor* e de *S. senegalensis* ao DCF, em concentrações ecologicamente relevantes e por intermédio da água, não causaram qualquer neurotoxicidade traduzida pela inibição da AChE. Sendo assim, os dados aqui obtidos contrariam os resultados obtidos no estudo de Gonzalez-Rey *et al.* [70], que demonstraram alterações significativas na atividade da AChE em mexilhões da espécie *M. galloprovincialis* expostos a uma concentração nominal ambientalmente relevante de DCF (250 ng/L) ao longo de 15 dias. Segundo estes autores, as concentrações de DCF detetadas em compartimentos hídricos podem causar comprometimento da atividade das colinesterases.

Alguns fármacos, incluindo o DCF, podem estimular a produção de ROS em organismos aquáticos e provocar danos oxidativos [15], o que significa que, apesar de não constatarmos alterações significativas ao nível da atividade da AChE, não quer dizer que os resíduos do DCF não estejam a causar toxicidade noutros níveis, nomeadamente ao nível da resposta e defesa antioxidante. Alguns estudos utilizaram biomarcadores de stress oxidativo como SOD, CAT, GST e GPx para avaliar a toxicidade do DCF [15,29]. Estes estudos sugerem inibição da GPx dependente de selênio, bem como a GPx total após exposições agudas da *D. magna* a 0,0005, 0,5 e 7,2 mg/L do DCF. Resultados obtidos após sete dias de

exposição no peixe *D. rerio* a 1,0 mg/L de DCF demonstraram aumento dos níveis da GST e CAT.

O potencial (eco)toxicológico desta substância é, inclusivamente, aumentado pela sua tendência para sofrer bioacumulação. O DCF é conhecido por bioacumular em organismos não-alvo, como peixes, nos quais causa efeitos celulares no fígado, rim e nas brânquias [9,63]. Num estudo de Schwaiger *et al.* [9], após as trutas da espécie *Oncorhynchus mykiss* serem expostas a uma concentração de 1 µg/L de DCF durante 28 dias, foram determinados no músculo e no fígado fatores de bioconcentração (BCF) de 69 e 2 732, respetivamente. No estudo de Mehinto *et al.* [122] a truta da espécie *O. mykiss* foi exposta durante 21 dias às concentrações 0,5, 1, 5 e 25 µg/, e análises das bÍlis revelaram BCF de 509 e 657 do DCF e dos seus metabolitos.

O coeficiente de partição octanol-Água, aparentemente elevado DCF ( $P_{OH}$  4.51) gera uma certa preocupação em relação ao potencial deste composto em bioacumular [9]. Os nossos resultados referentes ao ensaio de transferência de resÍduos do DCF ao longo da cadeia trÓfica demonstraram a ocorrência de uma diminuição significativa na atividade da AChE nos peixes expostos à concentração mais elevada do DCF (2 µg/L) via alimento contaminado (poliqueta), comparativamente ao controlo. Estes resultados sugerem que resÍduos ou metabolitos do DCF possam ser bioacumulados e transferidos ao longo da cadeia trÓfica (i.e., biomagnificados). Este resultado estÁ de acordo com o estudo de Guiloski *et al.* [52], que verificou transferência de resÍduos de DCF ao longo da cadeia trÓfica utilizando diferentes espÉcies de peixes (*Hoplias malabaricus* alimentados duas vezes por semana, durante seis semanas, com peixes da espÉcie *Astyanax sp.* previamente contaminados com concentrações de DCF de 0,2; 2,0 ou 20 µg/L).

A interação com a enzima AChE dos peixes alimentados com poliquetas contaminados pode ser justificada em face do processo de metabolização do DCF. Nos mamÍferos, o DCF é metabolizado em diclofenac-1-O-acil glucuronido, um metabolito altamente instÁvel e reativo envolvido no mecanismo da hepatotoxicidade idiossincrática [123]. A biotransformação do DCF ocorre pela ação das enzimas CYP450 presentes não só no fígado, mas também em outros Órgãos, como rins, brânquias, intestino, cérebro, coração [124]. Nos peixes, diferentes genes do complexo CYP450 foram caraterizados, o que demonstra que as mesmas famílias CYP450 também estÁo presentes nestes organismos e podem

ser responsáveis pela biotransformação do DCF em metabolitos hidroxilados [124, 125].

Também pela ação da luz solar ou de micro-organismos, o DCF é degradado em diversos metabolitos (nomeadamente 5,4'-dihidroxi-diclofenac, 3-dihidroxi-diclofenac, 4'-dihidrometil-diclofeanc, 3'-hidrometil-diclofenac, 4'-hidroxi-diclofenac e 5-hidroxi-diclofenac). Os dois últimos metabolitos são posteriormente oxidados em derivados de benzoquinonaimina, compostos que são altamente tóxicos para organismos aquáticos e os mais prevalentes em meio aquático [126,127]. Estes metabolitos levam à formação de ROS, ligando-se a grupos sulfidrílicos ao nível do citosol, assim como a enzimas ou proteínas de membrana contendo este mesmo grupo [123]. É, assim, possível sugerir que desta interação possa resultar a desnaturação e consequente inativação hidrolítica de enzimas específicas, como o caso da acetilcolinesterase de peixes expostos a estes metabolitos tóxicos.

Com efeito, os metabolitos do DCF podem, também, surgir em compartimentos aquáticos em todo o mundo e está reportado que alguns destes metabolitos são até mesmo mais tóxicos do que o próprio fármaco [59].

A bioacumulação dos resíduos de DCF também pode gerar consequências ao nível económico. Na aquacultura os poliquetas são organismos bastante utilizados como alimento vivo. Deste modo, com o aumento da população mundial e estabilização da pesca profissional, a aquacultura constitui-se como uma boa alternativa às formas tradicionais de fornecimento de peixes para o consumo. Esta atividade abrange mais de 20% da produção total de peixes na União Europeia, produzindo cerca de 1,2 milhões de toneladas e quatro biliões de euros em valor [128]. Sendo os poliquetas utilizados com grande frequência nestas indústrias, estes podem estar a causar transferências de resíduos de fármacos com grande potencial para bioacumulação e causar efeitos em espécies de níveis tróficos superiores, nomeadamente crustáceos, moluscos e peixes, que são posteriormente utilizadas na alimentação humana.

Por outro lado, ao nível ecológico, os poliquetas (*H. diversicolor*) constituem a base de várias cadeias alimentares, o que sugere que alterações nestas espécies (i.e., bioacumulação de DCF) podem, consequentemente, colocar em risco outras espécies de níveis tróficos superiores. Possíveis alterações na comunidade de *H.*

*diversicolor* podem prejudicar as funções essenciais, como bioturbação, reciclagem e transporte de oxigênio e material dissolvido nos sedimentos.

Relativamente ao *S. senegalensis* que vive em fundos arenosos e que se alimenta de pequenos invertebrados, incluindo poliquetas das espécies *H. diversicolor*, poderá estar a ser afetado pela biomagnificação dos resíduos do DCF, sendo um peixe com nível económico significativo e servindo como fonte de proteína para os seres humanos, esta biomagnificação dos resíduos do DCF [102] possivelmente poderá ter efeitos nefastos para os organismos superiores, incluindo o Homem.

## 5. Conclusão e perspetivas futuras

Não se conseguiu determinar efeitos toxicológicos resultantes da exposição ao DCF por via da contaminação da água em ambas as espécies testadas, *H. diversicolor* e *S. senegalensis*. No entanto, estudaram-se os processos de transferência dos resíduos do DCF numa cadeia trófica simulada, nomeadamente através da exposição crónica do peixe *S. senegalensis* via alimento. Deste modo, foi possível observar a Bioacumulação de DCF ou dos seus resíduos por intermédio do poliqueta *H. diversicolor*, que foram eventualmente transferidos para uma espécie de nível trófico superior, o *S. senegalensis*, que evidenciou alterações na atividade da enzima previamente referida.

O presente trabalho demonstrou ser importante, no sentido em que não existiam estudos (eco)toxicológicos com DCF nestas duas espécies, que, além de desempenharem funções bastante importantes no ecossistema, são espécies que possuem um valor comercial considerável. A utilização do DCF como poluente foi também pertinente, uma vez que este fármaco é abundante e sistematicamente encontrado em estudos de monitorização do ambiente aquático. Como perspetivas futuras, a avaliação da defesa metabólica, antioxidante e a ocorrência de alterações histopatológicas poderiam ser enquadradas como continuação deste trabalho experimental, com vista à aferição mais profunda das alterações que níveis ecologicamente relevantes deste composto poderão exercer em organismos aquáticos não-alvo.

# Bibliografia

1. Basso, P. (2004) A Farmácia e o Medicamento- uma história concisa.
2. Infarmed (2016) Relatório de Monitorização Mensal. Acedido em 10 de Março de 2017 em: <http://www.aenfermagemeasleis.pt/2016/09/30/relatorio-de-monitorizacao-mensal-de-julho-de-2016-e-meses-anteriores-infarmed/>
3. Infarmed, (2014) Estatística do Medicamento. Acedido em 15 de Março de 2017.
4. Ji, K., Liu, X. Lee, S. Kang, S. Kho, Y. Giesy, J.P. Choi, K. (2013) Effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on hormones and genes of the hypothalamic-pituitary-gonad axis, and reproduction of zebrafish. *Journal Hazardous Materials*. 254-255: 242-51.
5. Nadanaciva, S., Aleo, M.D. Strock, C.J. Stedman, D.B. Wang, H. Will, Y. (2013) Toxicity assessments of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in isolated mitochondria, rat hepatocytes, and zebrafish show good concordance across chemical classes. *Toxicology Applied Pharmacology*. 272(2): 272-80.
6. Cunningham, V.L., Binks, S.P. e Olson, M.J. (2009) Human health risk assessment from the presence of human pharmaceuticals in the aquatic environment. *Regulatory Toxicology Pharmacology* 53(1): 39-45.
7. Kümmerer, K. (2010) Pharmaceuticals in the Environment. *Annual Review of Environment and Resources*. 35(1): 57-75.
8. Saravanan, M., Devi, KU. Malarvizhi, A. Ramesh, M. (2012) Effects of Ibuprofen on hematological, biochemical and enzymological parameters of blood in an Indian major carp, *Cirrhinus mrigala*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 34(1): 14-22.
9. Schwaiger, J., Ferling, H. Mallow, U. Wintermayr, H. Negele, H.D. (2004) Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac. Part I: histopathological alterations and bioaccumulation in rainbow trout. *Aquatic Toxicology*. 68(2): 141-50.

10. Lazarus, R.S., Rattener, B.A. Brooks, B.W. Du, B. McGowan, P.C. Blazer, V.S. Ottinger, M.A. (2015) Exposure and food web transfer of pharmaceuticals in ospreys (*Pandion haliaetus*): Predictive model and empirical data. *Integrated Environmental Assessment and Management*.11(1): 118-29.
11. Santos, L.H., Araujo, A.N. Fachini, A. Pena, A. Delerue, C. Montenegro, M.C. (2010) Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *Journal of Hazardous Materials* 175(1-3): 45-95.
12. Nunes, B., Carvalho, F. and Guilhermino, L. (2005) Acute toxicity of widely used pharmaceuticals in aquatic species: *Gambusia holbrooki*, *Artemia parthenogenetica* and *Tetraselmis chuii*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 61(3): 413-9.
13. Nunes, B. (2010) Fármacos no ambiente: implicações ecotoxicológicas. *Captar*. 2: 9-20.
14. Cleuvers, M. (2004) Mixture toxicity of the anti-inflammatory drugs diclofenac, ibuprofen, naproxen, and acetylsalicylic acid. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 59(3): 309-315.
15. Oliveira, L.L., Antunes, S.C. Gonçalves, F. Rocha, O. Nunes, B. (2015) Evaluation of ecotoxicological effects of drugs on *Daphnia magna* using different enzymatic biomarkers. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 119: 123-31.
16. Winker, M., Faika, D. Gulyas, H. Otterpohl, R. (2008) A comparison of human pharmaceutical concentrations in raw municipal wastewater and yellowwater. *Science of the Total Environment*. 399(1-3): 96-104.
17. Van der Oost, R., Beyer, J. e Vermeulen, N. (2003) Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 13: 57-149.
18. Kummerer, K. (2001) Drugs in the environment. emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources - a review. *Chemosphere* 45: 957-969.
19. Routledge, D.S., Desbrow, C. Brighty, C. G. C. Waldock, M. e Sumpter, J. P. (1998) Identification of Estrogenic Chemicals in STW Effluent. 2. In Vivo Responses in Trout and Roach. *Environmental Science & Technology*, 32: 1559-1565.

20. Susan Jobling, M.N., Tyler, C. R. Brighty, G. e Sumpter, J.P. (1998) Widespread Sexual Disruption in Wild Fish. *Environmental Science & Technology* 32: 2498-2506.
21. Kim, S.D., Cho, J. Kim, I.S. Vanderford, B.J. Snyder, S.A. (2007) Occurrence and removal of pharmaceuticals and endocrine disruptors in South Korean surface, drinking, and waste waters. *Water Research*, 41(5): 1013-21.
22. Fent, K., Weston, A.A. e Caminada, D. (2006) Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology*, 76(2): 122-59.
23. Lapworth, D.J., Baran, N. Stuart, M.E. Ward, R.S. (2012) Emerging organic contaminants in groundwater: A review of sources, fate and occurrence. *Environmental Pollution*. 163: 287-303.
24. EMEA, (2005) Note for Guidance on Environmental Risk Assessment of Medicinal Products for Human Use. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products.
25. Kummerer, K. (2009) The presence of pharmaceuticals in the environment due to human use-present knowledge and future challenges. *Journal of Environmental Management*. 90(8): 2354-66
26. Landry, K.A. e Boyer, T.H. (2016) Life cycle assessment and costing of urine source separation: Focus on nonsteroidal anti-inflammatory drug removal. *Water Research*. 105: 487-495.
27. Lin, A.Y., Yu, T.H. e Lateef, S.K. (2009) Removal of pharmaceuticals in secondary wastewater treatment processes in Taiwan. *Journal of Hazardous Materials*. 167(1-3): 1163-9.
28. Gracia-Lor, E., Sancho, J.V. Serrano, R. Hernandez, F. (2012) Occurrence and removal of pharmaceuticals in wastewater treatment plants at the Spanish Mediterranean area of Valencia. *Chemosphere*. 87(5): 453-62.
29. Diniz, M.S., Salgado, R. Pereira, V.J. Carvalho, G. Oehmen, A. Reis, M.A. Noronha, J.P. (2015) Ecotoxicity of ketoprofen, diclofenac, atenolol and their photolysis byproducts in zebrafish (*Danio rerio*). *Science of Total Environment*. 505: 282-9.
30. Boxall, A.B., et al. (2012) Pharmaceuticals and personal care products in the environment: what are the big questions? *Environmental Health Perspectives*. 120(9): 1221-9.

31. Cleuvers, M. (2003) Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. *Toxicology Letters*. 142(3): 185-194.
32. Ashton, D., Hilton, M. e Thomas, K.V. (2004) Investigating the environmental transport of human pharmaceuticals to streams in the United Kingdom. *Science of Total Environment*. 333(1-3): 167-84.
33. Wiegel, S., Aulinger, A. Brockmeyer, R. Harms, H. Loffler, J. Schmidt, R. Stachel, B. Von Tumpling, W. Wanke, A. (2004) Pharmaceuticals in the river Elbe and its tributaries. *Chemosphere*. 57(2): 107-26.
34. Bartels, P. e von Tumpling, W. Jr. (2007) Solar radiation influence on the decomposition process of diclofenac in surface waters. *Science of Total Environment*. 374(1): 143-55.
35. Scheurell, M., Franke, S. Shah, R.M. Huhnerfuss, H. (2009) Occurrence of diclofenac and its metabolites in surface water and effluent samples from Karachi, Pakistan. *Chemosphere*. 77(6): 870-6.
36. Garrison, A.W., Pope, J.D. e Allen, F.R. (1976) Identification and Analysis of Organic Pollutants in Water, ed. C.H. Keith. Ann Arbor Science: Michigan.
37. Terzic, S., Senta, I. Ahel, M. Gros, M. Petrovic, M. Barcelo, D. Muller, J. Knepper, T. Marti, I. Venture, F. Jovancic, P. Jabucar, D. (2008) Occurrence and fate of emerging wastewater contaminants in Western Balkan Region. *Science of the Total Environment*, 399(1-3): 66-77.
38. Zorita, S., Martensson, L. e Mathiasson, L. (2009) Occurrence and removal of pharmaceuticals in a municipal sewage treatment system in the south of Sweden. *Science of the Total Environment* 407(8): 2760-70.
39. Singh, K.P., Rai, P. Singh, AK. Verma, P. Gupta, S. (2014) Occurrence of pharmaceuticals in urban wastewater of north Indian cities and risk assessment. *Environmental Monitoring and Assessment* 186(10): 6663-82.
40. Sui, Q., Xuqi, C. Shuguang, L. Wentao, Z. Zhaofu, Q. Gang, Y. (2015) Occurrence, sources and fate of pharmaceuticals and personal care products in the groundwater: A review. *Emerging Contaminants*. 1(1): 14- 24.
41. Marco-Urrea, E., Pérez-Trijullo, M. Cruz-Marató, C. Caminal, G. Vicent, T. (2010) Degradation of the drug sodium diclofenac by *Trametes versicolor* pellets and

- identification of some intermediates by NMR. *Journal of Hazardous Materials*. 176(1-3): 836-42.
42. Zhang, D.Q., Hua, T. Gersberg, R.M. Tan, S.K. (2012) Fate of diclofenac in wetland mesocosms planted with *Scirpus validus*. *Ecological Engineering*. 49: 59-64.
43. Zhang, Y., Geissen, S.U. e Gal, C. (2008) Carbamazepine and diclofenac: removal in wastewater treatment plants and occurrence in water bodies. *Chemosphere*. 73(8): 1151-61.
44. Palmer, E. (2012) Top 20 generic molecules. Acedida em 17 de Março de 2017 em: <http://www.fiercepharma.com>
45. Diretiva 2013/39/EU do Parlamento Europeu e do Concelho (2013). Acedida em 17 de Março de 2017 em: [www.snirh.apambiente.pt](http://www.snirh.apambiente.pt)
46. Vane, J.R. e Botting, R.M. (1998) Mechanism of action of antiinflammatory drugs. *International Journal of Tissue Reactions*. 20(1): 3-15.
47. Hata, A.N. e Breyer, R.M. (2004) Pharmacology and signaling of prostaglandin receptors: multiple roles in inflammation and immune modulation. *Pharmacology & Therapeutics*. 103(2): 147-66.
48. Kummer, L.C. e Coelho, T.C.R.B. (2002) Antiinflamatórios Não Esteróides Inibidores da Ciclooxygenase-2 (COX-2): Aspectos Atuais. *Revista Brasileira de Anestesiologia*. 52: 498 - 512.
49. Sanchez, S., De la Lastra, C.A. Ortiz, A. Motilva, V. Martin, M.J. (2002) Gastrointestinal Tolerability of Metamizol, Acetaminophen, and Diclofenac in Subchronic Treatment in Rats. *Digestive Diseases and Sciences*. 47(12): 2791-2798.
50. Chan, L.Y., Chiu, P. Siu, S.S. Lau, T.K. (2001) A study of diclofenac-induced teratogenicity during organogenesis using a whole rat embryo culture model. *Human Reproduction*. 16(11): 2390-2393.
51. Letzel, M., Metzner, G. e Letzel, T. (2009) Exposure assessment of the pharmaceutical diclofenac based on long-term measurements of the aquatic input. *Environment International* 35(2): 363-8.

52. Guiloski, I.C., Ribas, J.L. Pereira Lda, S. Neves, A.P. Silva de Assis, H.C. (2015) Effects of trophic exposure to dexamethasone and diclofenac in freshwater fish. *Ecotoxicology and Environment Safety*. 114: 204-11.
53. Praskova, E., et al. (2014) Effects of subchronic exposure of diclofenac on growth, histopathological changes, and oxidative stress in zebrafish (*Danio rerio*). *Scientific World Journal*. 2014: 645737.
54. Vane, J.R. e Botting, R.M. (1998) Mechanism of action of antiinflammatory drugs. *International Journal of Tissue Reactions*. 20(1): 3-15.
55. Gan, T.J. (2010) Diclofenac: an update on its mechanism of action and safety profile. *Current Medical Research Opinion*. 26(7): 1715-31.
56. Banks, A.T., Zimmerman, H.J. Ishak, K.G. Hater, J.G. (1995) Diclofenac-Associated Hepatotoxicity: Analysis of 180 Reported to the Food and Drug Administration as Adverse Reactions. *Hepatology*. 5: 820-827.
57. Aithal, G.P. e Day, C.P. (2007) Nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced hepatotoxicity. *Clinics in Liver Disease*. 11(3): 563-75, vi-vii.
58. Van Leeuwen, J.S., Vredenburg, G. Dragovic, S. Tjong, T.F. Voos, J.C. Vermeleu, N.P. (2011) Metabolism related toxicity of diclofenac in yeast as model system. *Toxicology Letters*. 200(3): 162-8.
59. Lonappan, L., Brar, S.K. Das, R.K. Verma, M. Surampalli, R.Y. (2016) Diclofenac and its transformation products: Environmental occurrence and toxicity - A review. *Environmental International*. 96: 127-138
60. Madsen, K.G., Skonberg, C. Jurva, U. Cornett, C. Hansen, S.H. Johasen, T.N. Olsen, J. (2008) Bioactivation of Diclofenac in Vitro and in ViWo: Correlation to Electrochemical Studies. *Chemical Research in Toxicology*. 21(21): 1107-1119.
61. Lee, J., Ji, K. Lim Kho, Y. Kim, P. Choi, K. (2011) Chronic exposure to diclofenac on two freshwater cladocerans and Japanese medaka. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 74(5): 1216-25.
62. Ferrari, B.t., Paxéus, N. Lo Giudice, L. Pollio, A. Garric, J. (2003) Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters: study of carbamazepine, clofibric acid, and diclofenac. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 55(3): 359-370.

63. Hoeger, B., Kolner, B. Dietrich, D. R. Hitzfeld, B. (2005) Water-borne diclofenac affects kidney and gill integrity and selected immune parameters in brown trout (*Salmo trutta f. fario*). *Aquatic Toxicology*. 75(1): 53-64.
64. Mehinto, A., Hill, E.M. e Tyler, C.R. (2010) Uptake and Biological Effects of Environmentally Relevant Concentrations of the Nonsteroidal Anti- inflammatory Pharmaceutical Diclofenac in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environmental Science & Technology*. 44: 2176–2182.
65. Cuklev, F., Kristiansson, E. Fick, J. Asker, N. Forlin, L. Larsson, D.G. (2011) Diclofenac in fish: blood plasma levels similar to human therapeutic levels affect global hepatic gene expression. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 30(9): 2126-34.
66. Cuklev, F., Kristiansson, E. Fick, J. Asker, N. Forlin, L. Larsson, D.G. (2011) Diclofenac in fish: blood plasma levels similar to human therapeutic levels affect global hepatic gene expression. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 30(9): 2126-34.
67. Salgado, R., Pereira, V.J. Carvalho, G. Soeiro, R. Gaffney, V. Almeida, C. Vale Cardoso, V. Ferreira, E. Benoliel, M.J. Ternes, T.A. Oehmen, A. Reis, M.A. Norinha, J.P. (2013) Photodegradation kinetics and transformation products of ketoprofen, diclofenac and atenolol in pure water and treated wastewater. *Journal of Hazardous Materials*. 244-245: 516-27.
68. Nassef, M., Matsumoto, S. Seki, M. Khalil, I.J. Shimasaki, Y. Oshima, Y. Honjo, T. (2010) Acute effects of triclosan, diclofenac and carbamazepine on feeding performance of Japanese medaka fish (*Oryzias latipes*). *Chemosphere*. 80(9): 1095-100.
69. Schmidt, W., O'Rourke, K. Hernan, R. Quinn, B. (2011) Effects of the pharmaceuticals gemfibrozil and diclofenac on the marine mussel (*Mytilus* spp.) and their comparison with standardized toxicity tests. *Marine Pollution Bulletin*. 62(7): 1389-95.
70. Gonzalez-Rey, M. e Bebianno, M.J. (2014) Effects of non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) diclofenac exposure in mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic Toxicology*. 148: 221-30.

71. Kummerova, M., Zezulka, S. Babula, P. Triska, J. (2016) Possible ecological risk of two pharmaceuticals diclofenac and paracetamol demonstrated on a model plant *Lemna minor*. *Journal of Hazardous Materials*. 302: 351-61.
72. Shi, J.Q., Cheng, J. Wang, F.Y. Flamm, A. Wang, Z.Y. Yang, X. Gao, S.X. (2012) Acute toxicity and n-octanol/water partition coefficients of substituted thiophenols: determination and QSAR analysis. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 78: 134-41.
73. Schafer, S., et al. (2015) Bioaccumulation in aquatic systems: methodological approaches, monitoring and assessment. *Environmental Sciences Europe*. 27(1): 5.
74. Memmert, U., Peither, A. Burri, R. Weber, K. Schmidt, T. Sumpster, J.P. Hartmann, A. (2013) Diclofenac: New data on chronic toxicity and bioconcentration in fish. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 32(2): 442-52.
75. Monteiro, M., Quintaneiro, C. Nogueira, A.J. Morgado, F. Soares, A.M. Guilhermino, L. (2007) Impact of chemical exposure on the fish *Pomatoschistus microps* Kroyer (1838) in estuaries of the Portuguese Northwest coast. *Chemosphere*. 66(3): 514-22.
76. Maria, V.L., Ahmad, I. Oliveira, M. Serafim, A. Bebbiano, M.J. Pacheco, M. Santos, M.A. (2009) Wild juvenile *Dicentrarchus labrax* L. liver antioxidant and damage responses at Aveiro Lagoon, Portugal. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 72(7): 1861-70.
77. Islas-Flores, H., Gómez-Oliván, L.M. Galar-Martínez, M. Colín-Cruz, A. Neri- Cruz, N. García-Medina, S. (2013) Diclofenac-induced oxidative stress in brain, liver, gill and blood of common carp (*Cyprinus carpio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 92: 32-8.
78. Trimbell, J.A. (1998) Biomarkers of Toxicology. *Toxicology*, 129(1): 1-12.
79. Peakall, D.W. (1992) Animal biomarkers as pollution indicators. London: Chapman & Hall.
80. Xuereb, B., Lefevre, E. Garric, J. Geffard, O. (2009) Acetylcholinesterase activity in *Gammarus fossarum* (Crustacea Amphipoda): linking AChE inhibition and behavioural alteration. *Aquatic Toxicology*. 94(2): 114-22.

81. Nunes, B., Carvalho, F. e Guilhermino, L. (2005) Characterization and use of the total head soluble cholinesterases from mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) for screening of anticholinesterase activity. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 20(4): 369-76.
82. Leticia, A.G. e Gerardo, G.B. (2008) Determination of esterase activity and characterization of cholinesterases in the reef fish *Haemulon plumieri*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 71(3): 787-97.
83. Lionetto, M.G., Caricato, R. Calisi, A. Giordano, M.E. Schettino, T. (2013) Acetylcholinesterase as a biomarker in environmental and occupational medicine: new insights and future perspectives. *Biomed Research International*. 2013: 321213.
84. Ballesteros, M.L., Durando, P.E. Nores, M.L. Díaz, M.P. Bistoni, M.A. Wunderlin, D.A. (2009) Endosulfan induces changes in spontaneous swimming activity and acetylcholinesterase activity of *Jenynsia multidentata* (Anablepidae, Cyprinodontiformes). *Environmental Pollution*. 157(5): 1573-80.
85. 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): 581-94.
86. Durieux, E.D., Farver, T.B. Fitzgerald, P.S. Eder, K.J. Ostrach, D.J. (2011). Natural factors to consider when using acetylcholinesterase activity as neurotoxicity biomarker in Young-Of-Year striped bass (*Morone saxatilis*). *Fish Physiology Biochemistry*. 37(1): 21-9.
87. Nunes, B., Vidal, D. Barbosa, I. Soares, A.M.V.M. Freitas, R. (2016) Pollution effects on biochemical pathways determined in the polychaete *Hediste diversicolor* collected in three portuguese estuaries. *Environmental Science Processes & Impacts*. 18(9): 1208-19.
88. Dean, H.K. (2008) The use of polychaetes (Annelida) as indicator species of marine pollution: a review. *Revista de Biología Tropical*. 56: 11-38.
89. Rhee, J.S., Won, E.J. Choi, B.S. Park, G.S. Shin, K.H. Lee, Y.M. Lee, J.S. (2012) The polychaete, *Perinereis nuntia* ESTs and its use to uncover potential biomarker genes for molecular ecotoxicological studies. *Environmental Research*. 112: 48-57.

90. Hutchings, P. (1998) Biodiversity and functioning of polychaetes in benthic sediments. *Biodiversity and Conservation*. 7:1133-1145.
91. Costa, F.P., Oliveira, R.F. e Fonseca, L.C. (2006) Feeding Ecology of *Nereis diversicolor* (O.F. Müller) (Annelida, Polychaeta) on Estuarine and Lagoon Environments in the Southwest Coast of Portugal *Pan-American Journal of Aquatic Science*. 1: 114-126
92. Syptkowski, E., Bohlen, C. e Ambrose, W.G. (2010) Estimating the frequency and extent of bloodworm digging in Maine from aerial photography. *Fisheries Research* 101(1-2): 87-93.
93. Dhainaut, A. e Scaps, P. (2001) Immune defense and biological responses induced by toxics in Annelida. *Canadian Journal of Zoology*, 79(2): 233- 253.
94. Scaps, P. (2002) *Hydrobiologia*. 470(1/3): 203-218.
95. Papageorgiou, N., Arvanitidis, C. e Eleftheriou, A. (2006) Multicausal environmental severity: A flexible framework for microtidal sandy beaches and the role of polychaetes as an indicator taxon. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 70(4): 643-653.
96. Carvalho, A.N., Vaz, A. Sérgio, T.I.B. (2013) Sustainability of bait fishing harvesting in estuarine ecosystems – Case study in the Local Natural Reserve of Douro Estuary, Portugal *Journal of Integrated Coastal Zone Management*. 13: 157-168.
97. Oliva, M., et al., (2009) Sublethal and lethal toxicity in juvenile Senegal sole (*Solea senegalensis*) exposed to copper: a preliminary toxicity range-finding test. *Experimental Toxicologic Pathology*. 61(2): p. 113-21.
98. Matusse, N.R.D., Avaliação da qualidade dos ovos e das larvas de *Solea senegalensis* (Kaup, 1858) através da manipulação alimentar dos seus reprodutores. 2012.
99. Jimenez-Tenorio, N., Salamanca, M.J. Garcia-Luque, E. Gonzáles de Canales, M.L. DelValls, T.A. (2008) Chronic bioassay in benthic fish for the assessment of the quality of sediments in different areas of the coast of Spain impacted by acute and chronic oil spills. *Environmental Toxicology*. 23(5): p. 634-42.

100. Sole, M., Fortuny, A. e E. Mananos, E. (2014) Effects of selected xenobiotics on hepatic and plasmatic biomarkers in juveniles of *Solea senegalensis*. *Environmental Research*. 135: 227-35.
101. Costa, P.M., Diniz, M.S. Caeiro, S. Lobo, J. Martins, M. Ferreira, A.M. Caetano, M. Vale, C. DelValls, T.A. Costa, M. H. (2009) Histological biomarkers in liver and gills of juvenile *Solea senegalensis* exposed to contaminated estuarine sediments: a weighted indices approach. *Aquatic Toxicology*. 92(3): 202-12.
102. Oliva, M., González de Canales, M.L. Gravato, C. Guilhermino, L. Perales, J. A. (2010) Biochemical effects and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in senegal sole (*Solea senegalensis*) from a Huelva estuary (SW Spain). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 73(8): 1842-51.
103. Sole, M., Vega, S. e Varo, I. (2012) Characterization of type "B" esterases and hepatic CYP450 isoenzymes in Senegalese sole for their further application in monitoring studies. *Ecotoxicology Environmental Safety* 78: 72-9.
104. Imsland, A.K., Foss, A. Conceição, L.E.C. Dinis, M.T. Delbare, D. Schram, E. Kamstra, A. Rema, P. White, P. (2003) A review of the culture potential of *Solea solea* and *S. senegalensis*. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. 13(4): 379-408.
105. García-López, A., Anguis, V. Couto, E. Canario, A.V.M. Canavate, J.P. Sarasquete, C. Martínez-Rodríguez, G. (2006) Non-invasive assessment of reproductive status and cycle of sex steroid levels in a captive wild broodstock of Senegalese sole *Solea senegalensis* (Kaup). *Aquaculture*. 254(1-4): 583-593.
106. Branco, C.M. (2003) Estudo da produção de linguado (*Solea senegalensis* Kaup, 1858) em tanques de terra, IPIMAR.: Portugal.
107. Dinis, M.T., Ribeiro, L. Soares, F. Sarasquete, C. (1999) A review on the cultivation potential of *Solea senegalensis* in Spain and in Portugal. *Aquaculture Research*. 176: 27-38.
108. Pinto, W., Aragão, C. Soares, F. Dinis, M.T. Conceição, L.E.C. (2007) Growth, stress response and free amino acid levels in Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup 1858) chronically exposed to exogenous ammonia. *Aquaculture Research*. 38(11): 1198-1204.

109. Guimaraes, L., Gravato, C. Santos, J. Monteiro, L.S. Guilhermino, L. (2009) Yellow eel (*Anguilla anguilla*) development in NW Portuguese estuaries with different contamination levels. *Ecotoxicology*. 18(4): 385-402.
110. Ferreira, M., Antunes, P. Gil, O. Reis-Henriques, M.A. (2004) Organochlorine contaminants in flounder (*Platichthys flesus*) and mullet (*Mugil cephalus*) from Douro estuary, and their use as sentinel species for environmental monitoring. *Aquatic Toxicology*. 69(4): 347-57.
111. Magalhaes, C.M., Joye, S.B. Moreira, R.M. Wiebe, W.J. Bordalo, A.A. (2005) Effect of salinity and inorganic nitrogen concentrations on nitrification and denitrification rates in intertidal sediments and rocky biofilms of the Douro River estuary, Portugal. *Water Research*. 39(9): 1783-94.
112. Bagarrão, R.M.E. (2013) Reprodução e crescimento do poliqueta *Hediste diversicolor* (O.F. Müller, 1776) sob diferentes condições ambientais. Tese de Mestrado. Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar e o Instituto Politécnico de Leiria Leiria. 60 pp.
113. OECD, Fish, Juvenile Growth Test (2000) OECD Guide Test Chem. 1 (2): p. 1-16.
114. Wison, J., Bunte, R. e Carty, A. (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): 785-789
115. Salas-Leiton, E., Anguis, V. Manchado, M. Canavate, J.P. (2008) Growth, feeding and oxygen consumption of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) juveniles stocked at different densities. *Aquaculture*. 285(1-4): 84-89.
116. Ellman, G.L., Courtney, K.D. Andres, V. Feather-Stone, R.M. (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity *Biochemical Pharmacology*. 7: 88-95.
117. Brandford, M.M. (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding *Analytical Biochemistry*. 72: 248-254
118. Praveen Rao, P.N., e Knaus, E.E. (2008) Evolution of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs): Cyclooxygenase (COX) Inhibition and Beyond *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*. 11: 81-110.

119. Shultz, S., et al. (2004) Diclofenac poisoning is widespread in declining vulture populations across the Indian subcontinent. *Proceedings. Biological Science.* 271 Suppl 6: S458-60.
120. Tixier, C., Singer, H.P. Oellers, S. Muller, S.R. (2003) Occurrence and Fate of Carbamazepine, Clofibric Acid, Diclofenac, Ibuprofen, Ketoprofen, and Naproxen in Surface Waters. *Environmental Science & Technology.* 37(6): 1061-1068.
121. Rowley, A.F., Vogan, C.L. Taylor, G.W. Clare, A.S. (2005) Prostaglandins in non-insectan invertebrates: recent insights and unsolved problems. *Journal of Experimental Biology.* 208(Pt 1): 3-14.
122. Mehinto, C.A., Hill, M.E. e Tyler, R.C. (2010) Uptake and Biological Effects of Environmentally Relevant Concentrations of the Nonsteroidal Anti-inflammatory Pharmaceutical Diclofenac in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environmental Science & Technology.* 44: 2176-2182.
123. Oviedo-Gomez, D.G., Galar-Martínez, M. García-Medina, S. Razo-Estrada, Gómez-Oliván, L.M. (2010) Diclofenac-enriched artificial sediment induces oxidative stress in *Hyalella azteca*. *Environmental Toxicology and Pharmacology.* 29(1): 39-43.
124. Stegeman, J.J. e Livingstone, D.R. (1998) Forms and functions of cytochrome P450. *Comparative Biochemistry and Physiology.* 121(C): 1-3.
125. Islas-Flores, H., Gómez-Oliván, L.M. Galar-Martínez, M. Colí-Cruz, A. García-Medina, S. (2013) Diclofenac-induced oxidative stress in brain, liver, gill and blood of common carp (*Cyprinus carpio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 92: 32-8.
126. Gomez-Olivan, L. M., Galar-Martínez, M. García-Medina, S. Valdés-Alanís, Islas-Flores, H. Neri-Cruz N. [2014] Genotoxic response and oxidative stress induced by diclofenac, ibuprofen and naproxen in *Daphnia magna*. *Drug Chemical Toxicology.* 37(4): p. 391-9.
127. Stulten, D., Zuhlke, S. Lamshoft, M. Spiteller, M. (2008) Occurrence of diclofenac and selected metabolites in sewage effluents. *Science Total Environment,* 405(1-3): p. 310-6.
128. Commission, F.-E. (2016) Facts and figures on the Common Fisheries Policy. p. 19.