



Universidade de Aveiro Departamento de Biologia
2007

**João José Morais
Joaquim**

Respostas Aguda e Crónica de *D. magna* e *D. longispina* a Diclofenac

dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Toxicologia, realizada sob a orientação científica do Professor Doutor Fernando Gonçalves, Professor Associado com Agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

in memoriam

Ana Filipa e Francisco Grade,

tempo nenhum conseguirá fazer com que vos esqueça.

o júri

presidente

Professor Doutor Fernando José Mendes Gonçalves

professor associado com agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Professor Doutor Ulisses Manuel Miranda Azeiteiro

professor auxiliar com agregação do Departamento de Ciências Exactas e Tecnológicas da Universidade Aberta - Porto

Professor Doutor Mário Jorge Verde Pereira

professor auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Professor Doutor Mário Guilherme Garcês Pacheco

professor auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

agradecimentos

Ao Prof. Doutor Fernando Gonçalves, meu orientador. Pela compreensão, pela ajuda, pela paciência, pelas qualidades humanas, por me ter permitido integrar uma equipa fantástica e pelos conhecimentos e capacidade científica transmitidos, que me ajudaram, para além do trabalho realizado, a ver a investigação por dentro.

Às doutorandas Catarina Marques e Joana Pereira. Não é um agradecimento, porque o que fizeram não cabe nos agradecimentos. A minha eterna gratidão pelo apoio, pelo conhecimento transmitido, pela ajuda em todos os momentos, pela disponibilidade, pela paciência, pela amizade. Acredito que em tudo serão recompensadas.

À Bruna, ao Diogo, ao Duarte e à Elisabete, pelo que vos roubei com a minha ausência e que nada fará recuperar. É por vocês!

Ao meu Pai, à minha Mãe e à minha Irmã, por nunca deixarem de acreditar que era possível e pelo apoio constante.

Aos colegas do LEAD, Bruno, Nelson, Sara, Sérgio e todos os que fui conhecendo, que me aceitaram no grupo, “aturaram” e emprestaram conhecimento para o trabalho realizado.

Aos meus amigos, cujos nomes não cabem aqui, pelo apoio e incentivo, não esquecendo que estiveram sempre presentes em todos os momentos.

À Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra, a minha Escola, aos colegas, pessoal não docente, alunos e ex-alunos, que acompanharam esta maratona, se interessaram e me incentivaram.

À Universidade de Aveiro e ao Departamento de Biologia pela oportunidade, pelo conhecimento que me disponibilizou e pelo exemplo de elevado humanismo institucional.

palavras-chave

Diclofenac, Toxicidade Aguda, Toxicidade Crónica, *D. magna*, *D. longispina*

resumo

O consumo de produtos farmacêuticos é, nas sociedades actuais, uma realidade em crescimento, originada em diversos factores. Este contínuo e crescente aumento de consumo induz, que cada vez mais, o ambiente e em particular os sistemas aquáticos, sejam o destino de resíduos farmacologicamente activos, sendo esta contaminação uma preocupação pela incorporação de substâncias nos ecossistemas que podem interferir em sistemas biológicos específicos. Neste sentido o presente trabalho teve como objectivo identificar e avaliar os efeitos produzidos pelo Diclofenac de Sódio, substância activa presente em diversos medicamentos (e.g., Voltaren® e Flameril®), em organismos aquáticos não-alvo. Para este efeito realizaram-se ensaios agudos e crónicos de cladóceros em que se compararam a espécie padrão – *Daphnia magna* – e autóctone – *Daphnia longispina* – para avaliação da sobrevivência, reprodução e crescimento.

D. magna, nos teste agudos, apresenta maior tolerância ao Diclofenac ($EC_{50} = 134.087$ mg/L) existindo uma maior sensibilidade de *D. longispina* ($EC_{50} = 35.353$ mg/L). O Diclofenac afecta significativamente a fecundidade ($LOEC=38.745$ mg/L) de *D. magna* e o crescimento somático ($LOEC=57.713$ mg/L), na concentração mais alta. Para *D. longispina* os “endpoints” sub-letais significativamente afectados pelo Diclofenac foram a fecundidade ($LOEC = 5.0$ mg/L), e a maturação ($LOEC = 2.5$ mg/L).

Nos testes crónicos foi ainda possível observar uma inibição significativa, em ambas as espécies, no número e tamanho dos neonatos, na primeira ninhada. Diclofenac, como substância activa com efeito farmacológico em humanos, inibe de uma maneira geral a sobrevivência, a reprodução e o crescimento das espécies de cladóceros testados neste estudo – *D. magna* e *D. longispina*. Contudo, as concentrações utilizadas para produzir quer os efeitos agudos quer os efeitos crónicos são superiores às concentrações normalmente detectadas em meios aquáticos.

Em conclusão, o Diclofenac afecta *D. longispina* em “endpoints” individuais (fecundidade e maturação), em oposição a *D. magna*, foi significativamente afectada na fecundidade e no crescimento somático, ao nível da concentração mais alta, utilizada no teste.

keywords

Diclofenac, Acute Toxicity, Chronic Toxicity, *D. magna*, *D. longispina*

abstract

Consumption of pharmaceutical products is, in our societies, a reality in growth, originated in several factors. This continues increase in consumption induces, more and more, that the environment and in matter, the aquatic systems are the destiny of active pharmacological residues, being this contamination a concern for the incorporation of substances in the environment that can interfere in specific biological systems.

In this sense the present work had as objective to identify and to evaluate the effects produced by Diclofenac Sodium, active substance present in several medicines (e.g. Voltaren® and Flameril®), in non-target aquatic organisms. For this goal we realize acute and chronic tests with cladocerans and in that we have compared the survival, reproduction and growth of *Daphnia magna* (a standard species) and *Daphnia longispina* (an autochthonous species). Diclofenac, are effective in the survivorship and reproduction of the two cladoceran species used in this study – *D. magna* and *D. longispina*. *D. magna* seems to be more tolerant to acute toxicity ($EC_{50} = 134.087$ mg/L) and we found more sensibility to Diclofenac in *D. longispina* ($EC_{50} = 35.353$ mg/L). Diclofenac significantly affected the fecundity ($LOEC=38.745$ mg/L) of *D. magna* and the somatic growth rate ($LOEC=57.713$ mg/L), at the last concentration tested. For *D. longispina* the sublethal endpoints significantly affected by Diclofenac was fecundity ($LOEC = 5.0$ mg/L), maturation ($LOEC = 2.5$ mg/L). In addition, in the chronic exposure, the number and size of neonates of first brood are also impaired, in both species.

Diclofenac, as an active substance with pharmacological effect for humans, generally impairs in the survivorship, reproduction and growth of the cladoceran species used in this study – *D. magna* and *D. longispina*. However, the concentration levels used to produce these effects in acute and chronic tests are much higher, if we compare with the concentration levels detected in the aquatic environment.

In conclusion, Diclofenac affect more *D. longispina* at individual-level endpoints (fecundity and maturation), in opposite to *D. magna*, where fecundity is impaired and the somatic growth rate is slightly, but significantly affected in the last concentration tested.

"Quanto mais aumenta o nosso conhecimento, mais evidente fica a nossa ignorância."

John F. Kennedy

INDICE

Capítulo I	8
<i>Introdução Geral</i>	9
1. Enquadramento do Tema	9
3. Objectivos	13
4. Estrutura da Dissertação	13
5. Referências Bibliográficas	14
Capítulo II	19
Medicamentos no ambiente - a review.....	20
1. Introdução	21
2. Medicamentos no ambiente	22
3. Vias de exposição, destino e efeitos	25
4. Consequências Biológicas	29
5. Referências Bibliográficas	32
Capítulo III	42
Standard and autochthonous Cladocera: acute and chronic effects of Diclofenac	43
1. Introduction	44
2. Material and Methods	46
3. Results	49
4. Discussion	58
5. Conclusion	61
6. References	62
Capítulo IV	70
<i>Discussão Geral</i>	71
<i>Referências Bibliográficas</i>	75

Capítulo I

Introdução Geral

Introdução Geral

1. Enquadramento do Tema

A utilização, crescente, de medicamentos é uma realidade nas sociedades desenvolvidas e conseqüentemente, a emissão de resíduos é também uma realidade, cada vez com maior impacto ambiental (Halling-Sørensen *et al.*, 1998; Stuer-Lauridsen *et al.*, 2000).

Segundo Fent *et al.*, (2006) na União Europeia, existem cerca de 3000 substâncias farmacêuticas diferentes, para uso humano, *e. g.* Anti-inflamatórios não esteróides, Contraceptivos orais, Antibióticos, Beta-bloqueantes, entre outros. Existe ainda um largo número de substâncias farmacêuticas, utilizadas em medicina veterinária, entre os quais os antibióticos e os anti-inflamatórios.

O recurso ao bem “medicamento” faz-se para diminuir o impacto das doenças e aumentar a qualidade de vida dos indivíduos, bem como a esperança de vida (Schwab *et al.*, 2005), sendo um bem importante e indispensável nas sociedades actuais (Dietrich *et al.*, 2002).

No entanto, as sociedades consumidoras não perspectivam, numa primeira fase, o resultado desse consumo, principalmente o que gera desperdícios e resíduos contaminantes para o ambiente. Essa utilização dos medicamentos pelo Homem e na agro-pecuária produz uma quantidade considerável de resíduos que são eliminados dos organismos e promovem uma acumulação ambiental, principalmente em meio aquático, através das águas residuais (Ternes, 1998; Kolpin *et al.*, 2002; Kosjek *et al.*, 2005; Zargarzadeh *et al.*, 2005; Brun *et al.*, 2006).

As doenças osteo-articulares, que podem provocar grande incapacidade física, com processos inflamatórios mais ou menos severos, fazem com que as sociedades actuais recorram em larga escala aos medicamentos anti-inflamatórios, fazendo com que este grupo fosse, segundo o INFARMED

(Instituto Nacional da Farmácia e do Medicamento), em 2004, um dos mais consumidos em Portugal, no grupo dos medicamentos participados pelo SNS (Serviço Nacional de Saúde).

Também as doenças reumáticas, que são definidas no Plano Nacional Contra as Doenças Reumáticas (PNCDR, 2004), como “doenças e alterações funcionais do sistema musculoesquelético de causa não traumática”, induzem um elevado consumo deste grupo farmacoterapêutico.

Ainda segundo o PNCDR, estudos elaborados desde 1976 em Portugal, apontam para uma prevalência que varia entre 20 e 30% e induz entre 16 a 23% de consultas de clínica geral, fazendo com que os encargos com os medicamentos para estas patologias se situem no 2º ou 3º lugar.

Segundo Daughton (2003), nos Estados Unidos, a quatro, em cada cinco pacientes, são prescritos medicamentos em cada consulta, o que confirma a grande utilização de medicamentos no geral.

A forma mais utilizada de Diclofenac nos medicamentos é o sal sódico (Pérez-Estrada *et al.*, 2005a), sendo classificado como um Anti-Inflamatório Não Esteróide (AINE) derivado do ácido acético (INFARMED, 2006). Este princípio activo apresenta diversas indicações terapêuticas - formas inflamatórias e degenerativas de artrite reumatóide; artrite reumatóide juvenil; espondilite anquilosante; osteoartrite e espondiloartrite, síndromes dolorosas da coluna vertebral, reumatismo não articular, crises agudas de gota, dor, inflamação e edema pós-traumáticos e pós-operatórios, patologias dolorosas e/ou inflamatórias em ginecologia (dismenorreia primária ou anexite), utilizando-se ainda como adjuvante nas infecções inflamatórias dolorosas graves do ouvido, nasais ou da garganta (faringo-amigdalite e otite) (RCM, 1994).

O Diclofenac de Sódio possui acção analgésica, antipirética e anti-inflamatória (Gilman, 1996) bem como anti-reumática e anti-artrítica (Poiger *et al.*, 2001; Pérez-Estrada *et al.*, 2005b).

Os AINEs, como é o caso Diclofenac, actuam inibindo de forma reversível ou irreversível, uma ou ambas as isoformas da enzima ciclooxigenase (COX-1 e COX-2), que catalisa a síntese de diferentes prostaglandinas do ácido araquidónico (Vane e Botting, 1998). Diclofenac é um AINE clássico que actua

inibindo quer a COX-1 quer a COX-2. Diferenças no tamanho do local de ligação são responsáveis pela selectividade destes fármacos (Kurumbail *et al.*, 1997; Penning *et al.*, 1997; Gierse *et al.*, 1999). As prostaglandinas desempenham um papel regulador numa variedade de processos fisiológicos e patológicos, em resposta imunológica e inflamatória (Park *et al.*, 2001) sendo formadas numa gama diversa de vertebrados e invertebrados (Song e Brash, 1991), tais como peixes, anfíbios e aves, bem como em invertebrados, como corais, esponjas, celenterados, moluscos, crustáceos e insectos (Cleuvers, 2004). Em artrópodes e moluscos, a actividade da COX é aparentemente responsável pela formação de prostaglandinas, mas estas enzimas ainda não foram purificadas e caracterizadas (Pedibhotla *et al.*, 1995).

2. Dados de Consumo em Portugal

Segundo dados estatísticos do INFARMED, a substância activa Diclofenac de Sódio situa-se entre o 3º e o 5º lugar em número de embalagens vendidas e comparticipadas pelo SNS, desde 1999, não entrando nestes dados as embalagens vendidas mas não comparticipadas pelo SNS e as utilizadas em meio hospitalar.

Os dados disponibilizados pelo INFARMED apontam para um consumo de anti-inflamatórios não esteróides em larga escala na população portuguesa, em consonância com os valores europeus, onde o consumo de alguns medicamentos ultrapassa as 100 toneladas/ano (CSTEE, 2001).

Fent *et al.*, (2006) referem que na Alemanha foram consumidas, no ano de 2001, aproximadamente 86 toneladas de Diclofenac, enquanto Jones *et al.*, (2002) referem que no Reino Unido, o valor anual de consumo de Diclofenac, se situa próximo das 26 toneladas.

O número de embalagens vendidas tem sido mais ou menos constante após 1999, conforme se pode constatar pelos dados apresentados na tabela 1, (INFARMED, Estatística do Medicamento, 2000, 2002, 2003, 2004 e 2005).

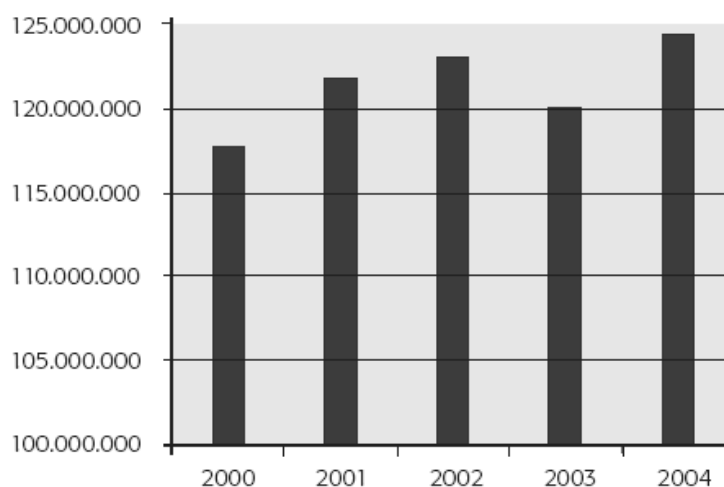
Tabela 1. Dados de Consumo do Diclofenac em Portugal, por embalagem
 Fonte: Estatística do Medicamento, INFARMED

Ano	Nº de embalagens	Ton.	Posição
1999	1 659 235	≅ 1,6	5º lugar
2001	1 952 214	≅ 1,9	4º lugar
2002	2 017 747	≅ 2,0	3º lugar
2003	1 986 824	≅ 1,9	4º lugar
2004	2 014 443	≅ 2,0	4º lugar

Os valores em toneladas, definidos na tabela 1, servem como referência e foram calculados por defeito, assumindo-se a quantidade mínima de comprimidos (20) por embalagem e a dosagem de 50 mg por comprimido. Reforça-se que estes valores não incluem as embalagens adquiridas sem receita médica e as que são utilizadas em meio hospitalar, pelo que os valores apresentados certamente pecam por defeito.

Ao nível das vendas de medicamentos no geral, os dados disponibilizados, relativos ao mercado do Serviço Nacional de Saúde (SNS), em número de embalagens, apresentam um aumento de 5,7% no período 2000-2004 (figura 1) - 117.739.548 embalagens vendidas em 2000 contra 124.408.494 embalagens vendidas em 2004. (Estatística do Medicamento, INFARMED, 2004).

Fig. 1. Número total de embalagens vendidas no mercado do SNS (2000-2004).
 Fonte: INFARMED, Estatística do Medicamento (2004)



3. Objectivos

Para o desenvolvimento do presente trabalho foram definidos os seguintes objectivos:

- estudar os efeitos agudos e crónicos (sobrevivência, crescimento e reprodução) induzidos pela substância activa Diclofenac de Sódio em duas espécies de cladóceros - *Daphnia magna* e *Daphnia longispina*.
- promover a comparação das respostas entre a espécie padrão (*D. magna*) e uma espécie autóctone (*D. longispina*), após exposição ao Diclofenac de Sódio.

4. Estrutura da Dissertação

A presente dissertação divide-se em quatro capítulos. O primeiro capítulo apresenta uma introdução geral sobre o tema, os objectivos e estrutura da dissertação, sendo o segundo capítulo, constituído por uma revisão bibliográfica sobre o tema. O terceiro capítulo é a explanação das respostas agudas e crónicas ao Diclofenac de Sódio, sendo o quarto capítulo composto por uma discussão geral e o conjunto das referências bibliográficas que serviram de base à construção da presente dissertação e que foram citadas em cada um dos capítulos.

Estes capítulos apresentam-se sob a forma de artigos científicos e têm uma estrutura sob a qual foram ou virão a ser submetidos para publicação em revistas científicas especializadas.

5. Referências Bibliográficas

Brun, G. L., Bernier, M., Losier, R., Doe, K., Jackman, P., Lee, H-B., 2006. Pharmaceutical active compounds in Atlantic Canadian Sewage Treatment Plant effluents and receiving waters, and potential for environmental effects as measured by acute and chronic aquatic toxicity. *Environ. Toxicol and Chem.* **25**(8):2163-2176.

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

CSTEE, 2001. Opinion on: Draft CPMP Discussion Paper on Environmental Risk Assessment of Medicinal Products for Human Use [Non-Genetically Modified Organism (Non-GMO) Containing]. C2/JCD/csteep/CPMPpaperRAssessHumPharm12062001/D(01), 24th CSTEE Plenary Meeting, Brussels, 12 June 2001. Disponível em http://ec.europa.eu/food/fs/sc/sct/out111_en.pdf.

Daughon, C. G., 2003. Cradle-to-Cradle Stewardship of Drugs for Minimizing Their Environmental Disposition While Promoting Human Health. II Drug Disposal, Waste Reduction and Future Directions. *Environ. Health Perspect.* **111**(5):75-785.

Dietrich, D. R., Webb, S. F., Petry, T., 2002. Hot spot pollutants: pharmaceuticals in the environment. *Toxicol. Let.* **131**:1-3.

Fent, K., Weston, A. A., Caminada, D., 2006. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology* **76**:122-159.

Gierse, J. K., Koboldt, C. M., Walker, M. C., Seibert, K., Isakson, P. C., 1999. Kinetic basis for selective inhibition of cyclo-oxygenases. *Biochem. J.* **339**(Pt3):607–614.

Gilman, Alfred, ed. lit. - Goodman & Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica. 9ª ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, cop. 1996. XXI, 1436 p. ISBN 970-10-1161.

Halling-Sørensen, B., Nielsen, S. N., Lanzky, P. F., Ingerslev, F., Holten Lützhøft, H. C., Jørgensen, S. E., 1998. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment – a review. *Chemosphere* **36**(2):357-393.

Instituto Nacional da Farmácia e do Medicamento (INFARMED), 2000. Estatística do Medicamento 1999. INFARMED, Lisboa, Portugal.

Instituto Nacional da Farmácia e do Medicamento (INFARMED), 2002. Estatística do Medicamento 2001. INFARMED, Lisboa, Portugal.

Instituto Nacional da Farmácia e do Medicamento (INFARMED), 2003. Estatística do Medicamento 2002. INFARMED, Lisboa, Portugal.

Instituto Nacional da Farmácia e do Medicamento (INFARMED), 2004. Estatística do Medicamento 2003. INFARMED, Lisboa, Portugal.

Instituto Nacional da Farmácia e do Medicamento (INFARMED), 2005. Estatística do Medicamento 2004. INFARMED, Lisboa, Portugal.

Instituto Nacional da Farmácia e do Medicamento (INFARMED), 2006. Prontuário Terapêutico on-line 6ª Ed. INFARMED, Lisboa, Portugal. Disponível em <http://www.infarmed.pt/prontuario/index.php>.

Jones, O. A. H., Voulvoulis, N., Lester J. N., 2002. Aquatic environmental assessment of the top 25 English prescription pharmaceuticals. *Wat. Res.*, **36**:5013-5022.

Kolpin, D. W., Furlong, E. T., Meyer, M. T., Thurman, E. M., Zaugg, S. D., Barber, L. B., Buxton, H. T., 2002. Pharmaceuticals, Hormones, and Other Organic Wastewater Contaminants in U.S. Streams, 1999-2000: A National Reconnaissance. *Environ. Sci. Technol.* **36**:1202-1211.

Kosjek, T., Heath, E., Krbavčič, A. 2005. Determination of non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAIDs) residues in water samples. *Environ. Intern.* **31**:679-685.

Kurumbail, R. G., Stevens, A. M., Gierse, J. K., McDonald, J. J., Stegeman, R. A., Pak, J. Y., Gildehaus, D., Miyashiro, J. M., Penning, T. D., Seibert, K., Isakson, P. C., Stallings, W. C., 1997. Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. *Nature* **384**(6610):644-648.

Park, J-W., Choi, Y. J., Suh, S-I., Kwon, T. K., 2001. Involvement of ERK and Protein Tyrosine Phosphatase Signaling Pathways in EGCG-Induced Cyclooxygenase-2 Expression in Raw 264.7 Cells. *Bioch. and Bioph. Res. Com.* **286**:721-725

Pedibhotla, V. K, Sarath, G., Sauer, J. R., Stanley-Samuelson, D. W., 1995. Prostaglandin biosynthesis and subcellular-localization of prostaglandin-H synthase activity in the lone star tick, *Amblyomma americanum*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **25**(9):1027-1039.

Penning, T. D., Talley, J. J., Bertenshaw, S. R., Carter, J. S., Collins, P. W., Docter, S., Graneto, M. J., Lee, L. F., Malecha, J. W., Miyashiro, J. M., Rogers, R. S., Rogier, D. J., Yu, S. S., Anderson, G. D., Burton, E. G., Cogburn, J. N., Gregory, S. A., Koboldt, C. M., Perkins, W. E., Seibert,

K., Veenhuizen, A. W., Zhang, Y. Y., Isakson, P. C., 1997. Synthesis and biological evaluation of the 1,5-diarylpyrazole class of cyclooxygenase-2 inhibitors: identification of 4-5-(4-methylphenyl)-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazol-1-yl benzenesulfonamide (SC-58635 Celecoxib). *J. Med. Chem.* **40**(9):1347–1365.

Pérez-Estrada, L.A., Maldonado, M.I., Gernjak, W., Agüera, A., Fernandez-Alba, A.R., Ballesteros, M.M., Malato, S., 2005a. Decomposition of diclofenac by solar driven photocatalysis at pilot plant scale. *Catalysis Today* **101**:219-226.

Pérez-Estrada, L. A., Malato, S., Gernjak, W., Agüera, A., Thurman, E. M., Ferrer, I., Fernandes-Alba, A. R., 2005b. Photo-Fenton Degradation of Diclofenac: Identification of Main Intermediates and Degradation Pathway. *Environ. Sci. Technol.* **39**:8300-8306.

Plano Nacional Contra as Doenças Reumáticas, 2004 – Direcção Geral da Saúde, Lisboa.

Poiger, T., Buser, H. R., Muller, M. D., 2001. Photodegradation of the pharmaceutical drug diclofenac in a lake: Pathway, field measurements, and mathematical modeling. – *Environ. Toxicol. Chem.* **20**:256-263.

RCM, 2004. Resumo das Características do Medicamento - Voltaren®. Parte IB. Novartis Farma – Produtos Farmacêuticos, S.A., Rio de Mouro, Portugal. 24 de Agosto de 1994.

Schwab, B. W., Hayes, E. P., Fiori, J. M., Mastrocco, F. J., Roden, N. M. Cragin, Meyerhoff, R. D., D’Aco, V. J., Anderson, P. D., 2005. Human pharmaceuticals in US surface waters: A human health risk assessment. *Reg. Toxicol. and Pharmacol.* **42**:296-312.

Song, W.C., Brash, A.R., 1991. Purification of an allene oxide synthase and identification of the enzyme as a cytochrome-P-450. *Science* **253**(5021):781-784.

Stuer-Lauridsen, F., Birkved, M., Hansen, I. P., Holten Lützhøft, H.-C., Halling-Sørensen, B., 2000. - Environmental risk assessment of human pharmaceuticals in Denmark after normal therapeutic use. *Chem.* **40**:783-793.

Ternes, T. A., 1998. Occurrence of Drugs in German Sewage Treatment Plants and Rivers. *Wat. Res.* **32**(11):3245-3260.

Vane, J. R., Botting, R. M., 1998. Mechanism of action of anti-inflammatory drugs. *Int. J. Tissue React.* **20**(1):3-15.

Zargarzadeh, A. H., Tavakoli, N., Hassanzadeh, A., 2005. A Survey on the Extent of Medication Storage and Wastage in Urban Iranian Households. *Clinical Therapeutics* , **27**(6):970-978.

Capítulo II

Medicamentos no ambiente – *a review*

Medicamentos no ambiente - *a review*

João Joaquim^{1,2}; Catarina Marques²; Joana Pereira²; Fernando Gonçalves²

¹Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra, Instituto Politécnico de Coimbra,
3040-997 Coimbra, Portugal

²Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro, 3810-193 Aveiro, Portugal

Paper in draft form

1. Introdução

A contaminação dos solos e das águas, com diversas substâncias produzidas pelo Homem, é hoje um assunto, objecto de múltiplos e variados estudos, sendo a preocupação com os efeitos nos ecossistemas uma fonte de diversas análises pela comunidade científica mundial, quer a nível aquático quer em solos (Jørgensen e Halling-Sørensen, 2000; Drillia *et al.*, 2005; Fent *et al.*, 2006).

Para além das substâncias farmacêuticas que chegam ao ambiente, têm sido estudados também os metabolitos originados no processo de metabolização dos medicamentos (Marques *et al.*, 2004a).

Uma das áreas de estudo prende-se com a “descarga” dos medicamentos de utilização humana e agro-pecuária sem o tratamento adequado, evitando deste modo a contaminação ambiental. Assim, constata-se que o desenvolvimento das sociedades actuais induz um consumo potenciado nas últimas décadas, o que tem contribuído para uma forte quebra da qualidade ambiental.

O aumento do consumo deste bem – o medicamento - tem induzido um crescimento exponencial de resíduos provenientes da inutilização em massa de produtos fora da validade, não só de cariz individual mas também dos hospitais, centros de saúde e outras instituições de saúde humana e veterinária. Por outro lado, os dejectos humanos e doutros animais são também uma fonte de contaminação ambiental não desprezível.

Pelo importante impacto toxicológico devido às características carcinogénicas, mutagénicas, teratogénicas e fetotóxicas acresce hoje, e no futuro cada vez mais, o aumento de resíduos provenientes da quantidade de medicamentos utilizados em quimioterapia oncológica, por via de desperdícios e da excreção nas águas residuais (Kümmerer *et al.*, 2000), apesar de hoje haver uma maior sensibilização e uma melhor formação dos profissionais na área da prevenção. Estas preocupações são traduzidas no paradigma do Homem ter que resolver os problemas que foi criando.

O aparecimento desta necessidade, resolver um problema existente e a tentativa de o prevenir, é esta a grande aposta – a prevenção – que levou ao

aparecimento da Ecotoxicologia que é o “ramo da toxicologia que estuda os efeitos dos tóxicos, causados por poluentes naturais ou sintéticos, nos constituintes dos ecossistemas, animal (incluindo o Homem), vegetal e microbiano, num contexto integrado” (Truhaut, 1977) e que pode ser entendida com o estudo integrado da ecologia com a toxicologia (Banks e Stark, 1998; Chapman, 2002) com o objectivo de compreender e prever os efeitos das substâncias em comunidades naturais em condições de exposição realísticas (Chapman, 2002).

2. Medicamentos no ambiente

Até ao início dos anos 90, a preocupação com a contaminação ambiental originada nos medicamentos e/ou nos seus produtos de degradação, não era reflectida nos estudos e artigos científicos e a avaliação do seu impacto era relativamente frágil (Kümmerer *et al.*, 2000; Jørgensen e Halling-Sørensen, 2000; Dietrich *et al.*, 2002). Nos últimos anos, o estudo da presença de resíduos nas águas superficiais, residuais e de consumo, provenientes da utilização de medicamentos, tem aumentado na literatura científica (Ternes, 1998; Daughton e Ternes, 1999; Kümmerer, 2001; Daughton e Jones-Lepp, 2001; Ternes *et al.*, 2001; Hilton *et al.*, 2003; Thomas e Foster, 2004; Brun *et al.*, 2006).

Um pouco por todo o Mundo existem estudos com referências de contaminação aquática com produtos farmacêuticos e/ou metabolitos, *e.g.* na Alemanha (Hirsch *et al.*, 1999; Sacher *et al.*, 2001), no Brasil (Stumpf *et al.*, 1999), no Canadá (Winkler *et al.*, 2001), na Holanda (Jonhson *et al.*, 2000), na Itália (Baronti *et al.*, 2000), na Suécia (Bendz *et al.*, 2005), na Suíça (Buser *et al.*, 1998), nos Estados Unidos da América (Kolpin *et al.*, 2002) e no Reino Unido (Xiao *et al.*, 2001).

Os estudos sobre a presença de substâncias farmacêuticas no ambiente são uma prioridade relativamente recente (Jørgensen e Halling-Sørensen, 2000; Daughton, 2003). Em estudos ambientais, a presença dos princípios

activos dos medicamentos, começam hoje, face ao aumento demográfico, a fazer parte do interesse da comunidade científica. Existem numerosos estudos, em meio aquático, que identificam o potencial contaminante e tóxico dos princípios activos utilizados em medicamentos e os seus metabolitos, (Stan e Haberer, 1997; Ternes, 1998; Halling-Sørensen *et al.*, 1998; Daughton e Ternes, 1999; Stumpf *et al.*, 1999, Marques *et al.*, 2004a; Marques *et al.*, 2004b). Anteriormente a este desenvolvimento do interesse científico, relacionado com a presença de resíduos de produtos farmacêuticos no meio aquático os estudos ocupavam-se sobretudo com a avaliação dos poluentes prioritários convencionais (*e.g.* herbicidas, metais) (Daughton e Ternes, 1999).

Numa revisão da literatura constatou-se que as principais substâncias analisadas, com impacto ambiental, eram os antibióticos, os antiparasitários e as hormonas (Halling-Sørensen *et al.*, 1998), embora exista um conjunto alargado de grupos terapêuticos já identificados no ambiente como por ex., para além dos anteriormente citados, os reguladores lipídicos, analgésicos, anti-cancerosos, anti-epilépticos, reguladores da pressão arterial (Ayscough *et al.*, 2000). Relativamente aos metabolitos das substâncias activas, os estudos são ainda escassos, com excepção dos metabolitos do ácido clofíbrico, ácido fenofíbrico e ácido salicílico (Ayscough *et al.*, 2000), existindo por isso, um conhecimento limitado sobre o comportamento destas substâncias.

Os fármacos, aliás à semelhança de outros xenobióticos, possuem propriedades físico-químicas específicas que vão determinar a sua persistência (Jones *et al.*, 2002), degradação, mobilidade, biodisponibilidade e bioacumulação nos organismos (Halling-Sørensen *et al.*, 1998, Jørgensen e Halling-Sørensen, 2000), o que em conjugação com a permanente introdução destas substâncias no ambiente, em função do seu generalizado e elevado consumo na Europa, onde alguns medicamentos chegam a ultrapassar as 100 toneladas/ano (CSTEE, 2001), fez com que estes se tornassem “pseudo-persistentes”, demonstrando uma elevada ubiquidade em diferentes ecossistemas (Daughton e Ternes, 1999; Zuccato *et al.*, 2000) e, permanecendo por longos períodos de tempo no ambiente.

Apesar de se encontrarem baixas concentrações de fármacos, variando entre ng/L e µg/L (Jones *et al.*, 2001; Han *et al.*, 2006) na análise de diferentes amostras ambientais, não deve ser desprezado o conhecimento de que estas substâncias activas interferem com sistemas biológicos específicos (e.g. actividades enzimáticas, receptores membranares, cascatas de sinalização), podendo, pelo seu largo espectro de acção, induzir alterações em organismos não-alvo (Zwiener e Frimmel, 2000), principalmente porque estas substâncias são introduzidas no ambiente de forma contínua (Drillia *et al.*, 2005; Crane *et al.*, 2006).

A presença de princípios activos farmacológicos, em vários tipos de águas (e.g. águas superficiais, efluentes), tem sido identificada e descrita em diversos estudos, na ordem dos ng/L e µg/L, e nas águas de consumo, na ordem dos ng/L (tabela 1).

Tabela 1. Concentração de alguns princípios activos, identificadas em várias amostras.

Princípio Activo	Origem	Concentração	Fonte
Ácido Acetilsalicílico	Água de Consumo/Alemanha	< 10 ng/L	Webb <i>et al.</i> (2003)
Ácido Acetilsalicílico	Efluente/Alemanha	0,22 µg/L	Ternes (1998)
Ácido Clofíbrico	Efluente/Alemanha	4,55 µg/L	Stan e Heberer (1997)
Ácido Clofíbrico	Água de Consumo/Alemanha	70 ng/L	Webb <i>et al.</i> (2003)
Bezafibrato	Água de Consumo/Alemanha	27 ng/L	Webb <i>et al.</i> (2003)
Carbamazepina	Água de Consumo/Alemanha	30 ng/L	Webb <i>et al.</i> (2003)
Carbamazepina	Efluente/França	1,20 µg/L	Ferrari <i>et al.</i> (2004)
Carbamazepina	Efluente/Alemanha	2,1 µg/L	Ternes (1998)
Carbamazepina	Água Superficial/Alemanha	0,25 µg/L	Ternes (1998)
Clorotetraciclina	Água natural/EUA	0,42 µg/L	Kolpin <i>et al.</i> (2002)
Diclofenac	Rio Main/Alemanha	0,14 µg/L	Ternes (1998)
Diclofenac	Rio Paraíba do Sul/ Brasil	0,06 µg/L	Stumpf <i>et al.</i> (1999)
Diclofenac	Água Superficial/Alemanha	1,03 µg/L	Heberer <i>et al.</i> (2002)
Diclofenac	Efluente/França	0,41 µg/L	Ferrari <i>et al.</i> (2004)
Diclofenac	Água de Consumo/Alemanha	6 ng/L	Webb <i>et al.</i> (2003)
Diclofenac	Efluente/Alemanha	0,81 µg/L	Ternes (1998)
Diclofenac	Água Superficial/Mar do Norte	6,2 ng/L	Weigel <i>et al.</i> (2002)
Eritromicina	Efluente/Alemanha	2,5 µg/L	Hirsch <i>et al.</i> (1999)
Ibuprofeno	Água de Consumo/Alemanha	3 ng/L	Webb <i>et al.</i> (2003)
Propranolol	Água Superficial/Alemanha	2,1 µg/L	Ternes (2001)
Sulfametoxazole	Efluente/Alemanha	2 µg/L	Ternes (2001)

Situações como a deposição atmosférica ou lixiviação e escorrências a partir de solos contaminados, ou ainda por descargas directas, fazem com que o destino final de diversos xenobióticos, fármacos incluídos, seja o meio aquático.

Existem dois factores que têm contribuído para a tomada de consciência deste problema – presença de produtos farmacêuticos no ambiente - por um lado o grande desenvolvimento de novos métodos analíticos, muito sensíveis que podem identificar substâncias químicas no ambiente em concentrações extremamente baixas, em alguns casos menos de uma parte por bilhão. O outro, é que a utilização de produtos farmacêuticos explodiu em parte devido a novas descobertas químicas, uma melhoria das condições de vida e a uma população crescente. Isto tem feito com que estejam sendo identificados, baixos níveis de produtos farmacêuticos, de uma forma ampla, em águas superficiais e subterrâneas (McBride e Wyckoff, 2002).

Diversos estudos (Halling-Sørensen *et al.*, 1998; Jørgensen e Halling-Sørensen, 2000; Boxall, 2004; Bendz *et al.*, 2005; Crane *et al.*, 2006; Cunningham *et al.*, 2006) referem que uma das vias de entrada de resíduos de substâncias farmacêuticas no ambiente é o resultado da degradação e excreção dos medicamentos no organismo humano e a outra via de contaminação ambiental são resíduos resultantes da produção de medicamentos.

3. Vias de exposição, destino e efeitos

Ao atravessar o organismo humano, os medicamentos sofrem transformações que ocorrem num processo que se designa por farmacocinética e que compreende quatro etapas: a absorção, a distribuição, a metabolização e a eliminação.

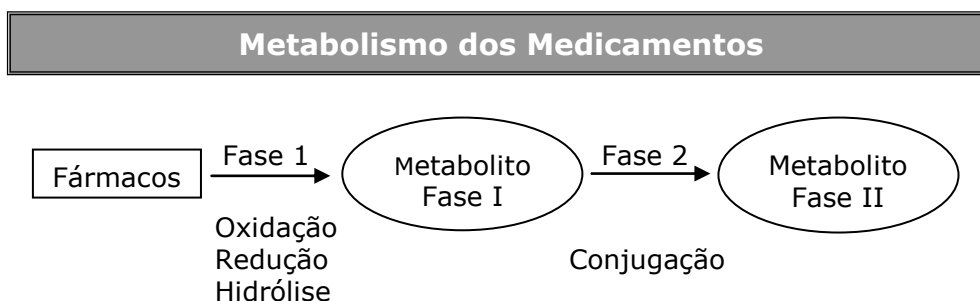
Relativamente ao metabolismo, importa descrever de forma sumária e geral a etapa farmacocinética da metabolização, etapa que o organismo utiliza

para promover alterações nas moléculas de modo a limitar a exposição aos xenobióticos.

Assim, e no caso dos fármacos, em tudo idêntico a outros xenobióticos, a metabolização (figura 2) divide-se em duas fases, a fase I onde ocorrem reacções de oxidação, redução e hidrólise, formando-se um ou mais metabolitos, existindo posteriormente a conjugação – fase II – conjugados estes que vão ser excretados do organismo, principalmente pela via urinária.

Fig. 2. Reacções que ocorrem na metabolização dos fármacos.

Adaptado de Gilman, (1996).



O estudo *in vitro* das propriedades físico-químicas das substâncias permite prever e antecipar algum do seu comportamento no ambiente, a sua toxicidade, a sua degradação e interacção com outras substâncias e com organismos, que mesmo sendo organismos não-alvo, podem sofrer alterações resultantes desta interacção, que está associada ao largo espectro de acção das substâncias (Zwiener e Frimmel, 2000).

Nos últimos anos a ocorrência e o destino das substâncias activas farmacológicas no ambiente aquático têm sido descritos como um assunto emergente na investigação ambiental (Stan e Heberer, 1997; Halling-Sørensen *et al.*, 1998; Daughton e Ternes, 1999; Daughton e Jones-Lepp, 2001; Kümmerer, 2001; Heberer, 2002). Os fármacos são considerados contaminantes ambientais devido ao facto de serem biologicamente activos e para além disso, a grande maioria possui características lipofílicas e frequentemente apresentam baixa biodegradabilidade no ambiente. Estas

propriedades intrínsecas apresentam um grande potencial para bioacumulação e persistência no ambiente (Christensen, 1998).

Diversos estudos têm-se ocupado com a análise da presença de medicamentos nas águas residuais tratadas, águas de superfície e água de consumo humano (Schröder *et al.*, 2002; Reynolds, 2003; Fent *et al.*, 2006).

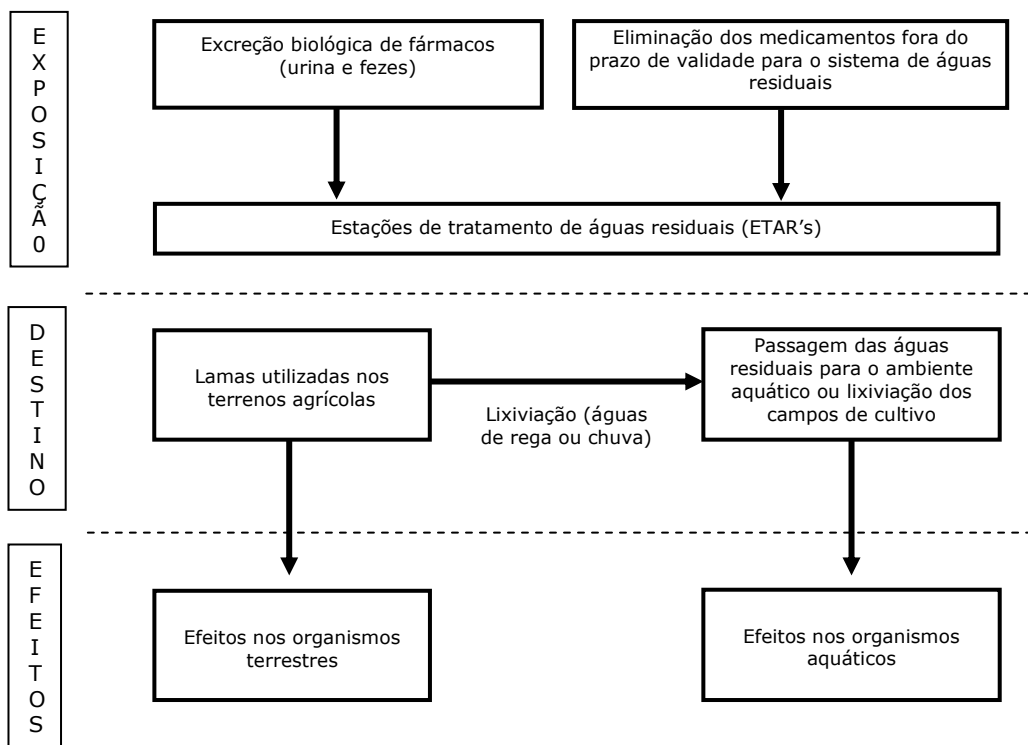
Estes estudos pretendem avaliar o comportamento das substâncias na interacção com os organismos e solos para tentar perceber o seu comportamento, nomeadamente a degradação (Poiger *et al.*, 2001) e a mobilidade (Drillia *et al.*, 2005) que sofrem, bem como o dos metabolitos que se formam no processo de biotransformação humana (Marques *et al.*, 2004a).

Há ainda referências à presença de produtos farmacêuticos e dos seus metabolitos nos efluentes das estações de tratamento de águas, que vão ser posteriormente descarregadas nos rios (Ashton *et al.*, 2004), sendo também analisados os efluentes hospitalares e domésticos e a consequente introdução nos ambientes aquáticos (Heberer e Feldman, 2005).

As descargas de resíduos de medicamentos provenientes de inutilizações (desperdícios e medicamentos fora de validade), bem como os resíduos provenientes da excreção humana (urina e fezes) acabam por chegar ao ambiente, produzindo efeitos em organismos terrestres e aquáticos (figura 3), que se podem classificar em três grupos, os que actuam a nível celular, a nível dos órgãos, das populações e dos ecossistemas, um segundo grupo muito particular, o dos antibióticos, que actuam sobre as bactérias podendo afectar o equilíbrio dos ecossistemas e, um terceiro grupo, o dos disruptores endócrinos (Jørgensen e Halling-Sørensen, 2000).

Apesar de todo o desenvolvimento ocorrido nos últimos anos, Fent *et al.*, (2006), consideram que relativamente aos testes de toxicidade, é necessário promover mais informação, sobre as exposições crónicas, onde ainda existe uma carência de conhecimento sobre os efeitos que efectivamente ocorrem nos organismos aquáticos e terrestres.

Fig. 3. Vias de exposição de medicamentos de uso humano no ambiente.
 [Adaptado de Jørgensen e Halling-Sørensen (2000)]



Um outro aspecto importante é a recolha de dados científicos sobre a exposição dos organismos aos produtos farmacêuticos, nomeadamente a exposição crónica de cladóceros ou peixes, referida por Ankley *et al.*, (2005), onde sejam avaliados parâmetros de não-letalidade como por exemplo o crescimento e a reprodução.

Antunes (2001) considera que os Cladocera são organismos aquáticos que têm um grande interesse nos estudos ecotoxicológicos pelas características que apresentam, concretamente por possuírem um ciclo de vida curto, em comparação com outros organismos como é o exemplo dos mamíferos, por possuírem uma elevada taxa de fecundidade e uma sensibilidade de largo espectro a variados factores o que lhes confere um importante interesse em estudos de cariz científico, apresentando ainda como vantagem o tipo de reprodução partenogenética que utilizam, o que permite a

obtenção de uma variabilidade genética relativamente baixa, permitindo assim uma boa comparabilidade nos estudos desenvolvidos em diferentes laboratórios.

Daphnia sp. é um organismo que tem sido bastante utilizado em testes de exposição, quer agudos quer crónicos, para avaliar a sobrevivência, crescimento, reprodução e stress (Ferrando *et al.*, 1999; Martinez-Jerónimo, *et al.*, 2000; Knops *et al.*, 2001; Flaherty e Dodson, 2005), de monitorização da qualidade da água (Leeuwangh, 1978; Michels *et al.*, 1999), efeitos de alterações dos níveis de alimento (Antunes *et al.*, 2004) e também como hipótese de serem utilizadas em alternativa aos mamíferos em avaliações preliminares de toxicidade letal para novos químicos (Guilhermino, 2000).

4. Consequências Biológicas

Os fármacos são investigados e desenvolvidos, tendo como alvo vias metabólicas e moleculares específicas, tanto nos humanos como em animais, mas também possuem frequentemente efeitos secundários importantes. Quando introduzidos no ambiente eles podem afectar os organismos pelas mesmas vias e atingir órgãos, tecidos, células ou biomoléculas com funções semelhantes às dos humanos (Fent *et al.*, 2006).

A preocupação central, resultante da presença de princípios activos farmacológicos e dos seus metabolitos nos ambientes aquáticos (Kümpel *et al.*, 2001; Tixier 2003), é o de identificar o impacto que efectivamente causam nos organismos não-alvo.

Assim, vários organismos não-alvo têm sido utilizados como modelos nos testes de toxicidade, quer agudos quer crónicos, para testar o impacto e o comportamento de medicamentos e simular os seus efeitos, *e.g.* Propranolol em *Daphnia magna* e *Desmodesmus subspicatus*, Metoprolol em *Desmodesmus subspicatus* e Diclofenac em *Lemna minor* (Cleuvers, 2003),

Ácido Acetilsalicílico em *Daphnia magna* e *Daphnia longispina* (Marques *et al.*, 2004b), antibióticos em *Lemna gibba* (Brain *et al.*, 2004), Diclofenac, Carbamazepina e Propranolol em *Danio rerio* (Frayse *et al.*, 2003), clofibrato e ácido clofíbrico em *Gambusia holbrooki* (Nunes *et al.*, 2004).

Flaherty e Dodson (2005) avaliaram parâmetros como o crescimento, a sobrevivência e a reprodução em *D. magna*, concluindo que as substâncias farmacêuticas, quer individualmente, quer presentes em misturas, (1) afectam o normal desenvolvimento e a reprodução desta espécie, (2) que a toxicidade aquática das misturas de substâncias farmacêuticas são imprevisíveis e complexas em comparação com os efeitos das substâncias isoladas e, (3) a toxicidade aquática é influenciada pela duração da exposição às substâncias farmacêuticas.

Nunes *et al.*, (2005), estudaram os efeitos agudos e crónicos do clofibrato e do ácido clofíbrico nas enzimas acetilcolinesterase (AChE), lactato desidrogenase (LDH) e catalase (CAT), registando, nos testes agudos, um decréscimo de actividade da CAT no fígado de *Gambusia holbrooki*, com ambas as substâncias e um aumento da actividade da LDH no músculo.

Efeitos fisiológicos e sobre a reprodução, foram realizado por Dzialowski *et al.*, (2005) em *D. magna*, com Antagonistas dos Receptores Beta Adrenérgicos (propranolol e metoprolol), apresentando alterações significativas, com ambas as substâncias, nos “endpoints” avaliados. Concluíram, neste estudo, que as substâncias afectavam a fecundidade na primeira e segunda gerações, bem como o parâmetro fisiológico cardíaco (heart rate).

Outro grupo de substâncias estudado é o dos estrogénios, presentes nos contraceptivos orais, classificados como disruptores endócrinos, que estão presentes no ambiente e que são responsáveis por alterações no sistema endócrino dos organismos humanos e animais (Hutchinson *et al.*, 1999; Ternes *et al.*, 1999; Parkonnen *et al.*, 2000; Quinn *et al.*, 2004).

Vários estudos têm também abordado o grupo dos antibióticos, pelos riscos associados à indução de resistência em bactérias, o que segundo Jørgensen e Halling-Sørensen, (2000) pode ser favorecido, mesmo em baixas concentrações.

Miranda *et al.* (1998), comprovaram a indução de resistência em *Aeromonas* (espécie isolada de ambientes aquáticos) com vários antibióticos estudados, *e.g.* tetraciclina, sulfametoxazol, cloranfenicol e trimetropim.

Estes estudos comprovam os potenciais danos que os produtos farmacêuticos podem provocar nos organismos expostos e justificam os estudos que devem ser conduzidos para potenciar o conhecimento do comportamento destas substâncias no ambiente.

5. Referências Bibliográficas

Ankley, G. T., Black, M. C., Garric, J., Hutchinson, T. H., Iguchi, T., 2005. A Framework for assessing the hazard of pharmaceutical materials to aquatic species. Chapter 6, Richard T. Williams (ed.), Human Pharmaceuticals: Assessing the Impacts on Aquatic Ecosystems. Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Pensacola, FL, 183-237.

Antunes, S. C., (2001) Variabilidade clonal de respostas crónicas de *Daphnia longispina* a diferentes níveis alimentares. Departamento de Biologia. Aveiro. Aveiro, Portugal. Mestrado. 71pp.

Antunes, S. C., Castro, B. B., Gonçalves, F., 2004. Effect of food level on the acute and chronic responses of daphnids to lindane. *Env. Pol.* **127**:367-375.

Ayscough, N. J., Fawell, J., Franklin, G., Young, W., 2000. Review of Human Pharmaceuticals in the Environment. UK Environmental Agency, Bristol.

Ashton, D., Hilton, M., Thomas, K.V., 2004. Investigating the environmental transport of human pharmaceuticals to streams in the United Kingdom. *Sci. Total Envir.* **333**:167-184.

Banks, J. E., Stark, J. D., 1998 - What Is Ecotoxicology? An Ad-Hoc Grab Bag or an Interdisciplinary Science?. *Integ. Biol.* **1**(5):195-204.

Baronti, C., Curini, R., d'Ascenzo, G., Di Corcia, A., Gentili, A., Samperi, R., 2000. Monitoring natural and synthetic estrogens at activated sludge sewage treatment plants and in a receiving river water. *Environ. Sci. Technol.* **34**(24):5059–5066.

Bendz, D., Paxéus, N. A., Ginn, T. R., Loge, F. J., 2005. Occurrence and fate of pharmaceutically active compounds in the environment, a case study: Höje River in Sweden. *Journal of Hazardous Materials* **122**:195-204.

Boxall, A. B. A., 2004. The environmental side effects of medication. European Molecular Biology Organization - EMBO reports **5**(12):1110-1116.

Brain, R. A., Johnson, D. J., Richards, S. M., Sanderson, H., Sibley, P. K., Solomon, K. R., 2004. Effects of 25 pharmaceutical compounds to Lemna gibba using a seven-day static-renewal test. *Environ. Toxicol. Chem.*, **23**(2):371–382.

Brun, G. L., Bernier, M., Losier, R., Doe, K., Jackman, P., Lee, H-B., 2006. Pharmaceutical active compounds in Atlantic Canadian Sewage Treatment Plant effluents and receiving waters, and potential for environmental effects as measured by acute and chronic aquatic toxicity. *Environ. Toxicol and Chem.* **25**(8):2163-2176.

Buser, H. R., Poiger, T., Müller, M. D., 1998. Occurrence and fate of the pharmaceutical drug diclofenac in surface waters: rapid photodegradation in a lake. *Environ. Sci. Technol.* **32**(22):3449–3456.

Chapman, P. M., 2002. Integrating toxicology and ecology: putting the “eco” into ecotoxicology. *Marine Pollut. Bullet.* **44**:7-15.

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

Crane, M., Watts, C., Boucard, T., 2006. Chronic aquatic environmental risks from exposure to human pharmaceuticals. *Sci. Total Envir.* **367**:23-41.

Christensen, F. M., 1998. Pharmaceuticals in the Environment - A Human Risk?. *Reg. Tox. Pharmac.* **28**:212–221.

CSTEE, 2001. Opinion on: Draft CPMP Discussion Paper on Environmental Risk Assessment of Medicinal Products for Human Use [Non-Genetically Modified Organism (Non-GMO) Containing]. C2/JCD/csteeop/CPMPpaperRAssessHumPharm12062001/D(01), 24th CSTEE Plenary Meeting, Brussels, 12 June 2001. Disponível em http://ec.europa.eu/food/fs/sc/sct/out111_en.pdf.

Cunningham, V. L., Buzby, M., Hutchinson, T., Mastrocco, F., Parke, N., Roden, N., 2006. Effects of Human Pharmaceuticals on Aquatic Life: Next Steps How do human pharmaceuticals get into the environment, and what are their effects?. American Chemical Society. *Envir. Sci. & Technol.* **40**:3457-3462.

Daughton, C. G., 2003. Cradle-to-Cradle Stewardship of Drugs for Minimizing Their Environmental Disposition While Promoting Human Health. II Drug Disposal, Waste Reduction and Future Directions. *Environ. Health Perspect.* **111**(5):75-785.

Daughton, C.G., Jones-Lepp, T., (Eds.), 2001. Pharmaceuticals and personal care products in the environment scientific and regulatory issues. Symposium Series 791, *American Chemical Society*, Washington DC, 56-69.

Daughton, C.G., Ternes, T.A., 1999. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change? *Environ. Health Perspect.* **107**:907-938.

Dietrich, D. R., Webb, S. F., Petry, T., 2002. Hot spot pollutants: pharmaceuticals in the environment. *Toxicology Letters* **131**:1-3.

Drillia, P., Stamatelatou, K., Lyberatos, L., 2005. Fate and mobility of pharmaceuticals in solid matrices. *Chemosphere* **60**:1034-1044.

Dzialowski, E. M., Turner, P. K., Brooks, B. W., 2005. Physiological and Reproductive Effects of Beta Adrenergic Receptor Antagonists in *Daphnia magna*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **50**:503–510.

Fent K., Weston, A. A., Caminada, D., 2006. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology* **76**:122-159.

Ferrando, M. D., Sancho, E., Andreu-Molner, E., 1999. Toxicity studies of tetradifon to *Daphnia magna*. *Ecotox. And Envir. Restoration*, **2**(1):14-18

Ferrari, B., Mons, R., Vollat, B., Fraysse, B., Paxéus, N., Lo Giudice, R., Pollio, A., Garric, J., 2004. Environmental risk assessment of six human pharmaceuticals: Are the current environmental risk assessment procedures sufficient for the protection of the aquatic environment. *Environ. Tox. Chem.* **23**(5):1344-1345.

Flaherty, C. M., Dodson, S. I., 2005. Effects of pharmaceuticals on *Daphnia* survival, growth, and reproduction. *Chemosphere*, **61**:200-207.

Fraysse, B., Noury, P., Mons, R., Garric, J., 2003. Danio rerio: a tool for ecotoxicity assessment of pharmaceuticals. CEMAGREF. ENVIRPHARMA-Lyon-april, 14/16, 2003.

Gilman, Alfred, ed. lit. - Goodman & Gilman : As bases farmacológicas da terapêutica. 9ª ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, cop. 1996. XXI, 1436 p. ISBN 970-10-1161.

Guilhermino, L., Diamantino, T., Silva, M. C., Soares, A. M. V. M., 2000. Acute Toxicity Test with *Daphnia magna*: An Alternative to Mammals in the Prescreening of Chemical Toxicity?. *Ecotox. and Environ. Safety* **46**:357-362.

Halling-Sørensen, B., Nielsen, S. N., Lanzky, P. F., Ingerslev, F., Holten Lützhøft, H. C., Jørgensen, S.E., 1998. Occurrence, fate and effects of

pharmaceutical substances in the environment – a review. *Chemosphere* **36**(2):357-393.

Han, G. H., Hur, H. G., Kim, S. D., 2006. Ecotoxicological risk of pharmaceuticals from wastewater treatment plants in Korea: occurrence and toxicity to *Daphnia magna*. *Environ. Tox. Chem.*, **25**(1):265–271.

Heberer, T. 2002. Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. *Tox. Lett.* **131**:5-17.

Heberer, T., Feldman, D., 2005. Contribution of effluents from hospitals and private households to the total loads of diclofenac and carbamazepine in municipal sewage effluents - modeling versus measurements. *Jour. Haz. Mat.* **122**:211-218.

Heberer, T., Reddersen, K., Mechlinski, A., 2002. From municipal sewage to drinking water: Fate and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment in urban areas. *Water Sci. Technol.* **46**:81–88.

Hilton, M. J., Thomas, K. V., Ashton, D., 2003. Targeted Monitoring Programme for Pharmaceuticals in the Aquatic Environment. R&D Technical Report P6-012/06/TR. Environment Agency.

Hirsch, R., Ternes, T., Haberer, K., Kratz, K-L., 1999. Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. *Sci. Total Environ.* **225**:109-118.

Hutchinson, T. H., Pounds, N. A., Hampel, M., Williams, T.D., 1999. Impact of natural and synthetic steroids on the survival, development and reproduction of marine copepods (*Tisbe battagliai*). *Sci. Total Envir.* **233**:167-179.

Jones O. A. H., Voulvoulis, N., Lester J. N., 2001. Human pharmaceuticals in the aquatic environment: a review. *Environ. Technol.* **22**:1383–1395.

Jones, O. A. H., Voulvoulis, N., Lester J. N., 2002. Aquatic environmental assessment of the top 25 English prescription pharmaceuticals. *Wat. Res.*, **36**:5013-5022.

Jonhson, A.C., Belfroid, A. Di Corcia, A., 2000. Estimating steroid oestrogen inputs into activated sludge treatment works and observations on their removal from the effluent. *Sci. Total Environ.* **225**:163-173.

Jørgensen, S. E., Halling-Sørensen, B., 2000. Drugs in the environment. *Chemosphere* **40**:691-699.

Knops, M., Altenburger, R., Segner, H., 2001. Alterations of physiological energetics, growth and reproduction of *Daphnia magna* under toxicant stress. *Aquatic Toxic.* **53**:79-90.

Kolpin, D. W., Furlong, E. T., Meyer, M. T., Thurman, E. M., Zaugg, S. D., Barber, L. B., Buxton, H. T., 2002. Pharmaceuticals, Hormones, and Other Organic Wastewater Contaminants in U.S. Streams, 1999-2000: A National Reconnaissance. *Environ. Sci. Technol.* **36**:1202-1211.

Kümmerer, K. (Ed.), 2001. Pharmaceuticals in the Environment. Sources, Fate, Effects and Risk. Springer, Berlin, Germany.

Kümmerer, K., Al-Ahmada, A., Bertram, B., Wießler, M., 2000. Biodegradability of antineoplastic compounds in screening tests: influence of glucosidation and of stereochemistry, *Chemosphere* **40**:767-773.

Kümpel, T., Alexy, R., Kümmerer, K., 2001. What do we know about antibiotics in the environment? In: Pharmaceuticals in the environment. Kümmerer K (Ed.) Berlin, Springer, 2001.

Leeuwangh, P., 1978. Toxicity Tests with Daphnids: It's Application in the Management of Water Quality. *Hydrobiologia*. **59**(2):145-148.

Marques, C. R., Abrantes, N., Gonçalves, F., 2004a. Life-History Traits of Standard and Autochthonous Cladocerans: II. Acute and Chronic Effects of Acetylsalicylic Acid Metabolites. *Environ. Toxicol.* **19**(5):527-540.

Marques, C. R., Abrantes, N., Gonçalves, F., 2004b. Life-history traits of standard and autochthonous cladocerans: I. Acute and chronic effects of acetylsalicylic acid. *Environ. Toxicol.* **19**(5):518-526.

Martínez-Jerónimo, F., Espinosa-Chávez, Félix., Villaseñor, R., 2000. Effect of Culture Volume and Adult Density on the Neonate Production of *Daphnia magna*, as a Test Organism for Aquatic Toxicity Tests. *Envir. Tox.* **15**(3):155-155.

McBride, M., Wyckoff, J., 2002 Emerging Liabilities from Pharmaceuticals and Personal Care Products. *Environ. Claims Journal* **14**(2):175-189.

Michels, E., Leynem, M., Cousyn, C., De Meester L., Ollevier, F., 1999. Phototactic behavior of *Daphnia* as a tool in the continuous monitoring of water quality: Experiments with a positively phototactic *Daphnia magna* clone. *Wat. Res.* **33**(2):401-408.

Miranda, C. D., Castillo, G., 1998. Resistance to antibiotic and heavy metals of motile aeromonads from Chilean freshwater. *Sci Total Environ.* **224**:167-176.

Nunes, B., Carvalho, F., Guilhermino, L., 2004. Acute and chronic effects of clofibrate and clofibric acid on the enzymes acetylcholinesterase, lactate dehydrogenase and catalase of the mosquitofish, *Gambusia holbrooki*. *Chemosphere*, **57**:1581-1589.

Nunes B., Carvalho F., Guilhermino L., 2005. Acute toxicity of widely used pharmaceuticals in aquatic species: *Gambusia holbrooki*, *Artemia parthenogenetica* and *Tetraselmis chuii*. *Ecotox. Environ. Saf.* **61**(3):413-419.

Parkkonen, J., Larsson, D. G. J., Adolfsson-Erici, M., Pettersson, M., Berg, A. H., Olsson, P-E., Förlin, L., 2000. Contraceptive pill residues in sewage effluent estrogenic to fish. *Marine Env. Res.* **50**:191-199.

Poiger, T., Buser, H. R., Muller, M. D., 2001. Photodegradation of the pharmaceutical drug diclofenac in a lake: Pathway, field measurements, and mathematical modeling. – *Environ. Toxicol. Chem.* **20**:256-263.

Quinn, B., Gagné, F., Costello, M., McKenzie, C., Wilson, J., Mothersill, C., 2004. The endocrine disrupting effect of municipal effluent on the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Aq. Toxic.* **66**:279-292.

Reynolds, K. A., 2003. Pharmaceuticals in Drinking Water Supplies. **45**(6): Disponível em <http://www.wcponline.com/column.cfm?T=T&ID=2199>.

Sacher, F., Lange, F. T., Brauch, H-J., Blankenhorn, I., 2001. Pharmaceuticals in groundwaters - Analytical methods and results of a monitoring program in Baden-Württemberg, Germany. *Journ. of Chrom.* **938**:199-210.

Schröder, A., Heß, O., Matthies, M., Scharenberg, B., Schmidt, R., 2002. Human pharmaceuticals in surface waters of the Elbe river basin - emission, fate and exposure assessment. 12th Annual Meeting of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC) Europe, Vienna, May 12 – 16. Disponível em <http://www.usf.uni-osnabrueck.de/projects/GREAT-ER/elberhine/pharma.pdf>.

Stan, H. J., Heberer, T., 1997. Pharmaceuticals in the environment. *Analisis Magazine* **25**:20-23.

Stumpf, M., Ternes, T. A., Wilken, R. D., Rodrigues, S. V., Baumann, W., 1999. Polar drug residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Sci. Total Environ.* **225**:135-141.

Ternes, T. A., 1998. Occurrence of Drugs in German Sewage Treatment Plants and Rivers. *Wat. Res.* **32**(11):3245-3260.

Ternes, T. A., 2001. Analytical methods for the determination of pharmaceuticals in aqueous environmental samples. *Trends Anal. Chem.* **20**:419-434.

Ternes, T.A., Bonerz, M., Schmidt, T., 2001. Determination of neutral pharmaceuticals in wastewater and rivers by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr.* **A938**:175/185.

Ternes, T. A., Stumpf, M., Mueller, J., Haberer, K., Wilken, R-D., Servos, M., 1999. Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants - I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. *Sci. Total Envir.* **225**:81-90.

Thomas, P. M., Foster, G. D., 2004 - Determination of Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs, Caffeine, and Triclosan in Wastewater by Gas Chromatography–Mass Spectrometry. *Jour. Environ. Sci. Health.* **A39**(8):1969-1978.

Tixier, C., Singer, H. P., Oellers, S., Müller, S.R., 2003. Occurrence and fate of carbamazepine, clofibric acid, diclofenac, ibuprofen, ketoprofen, and naproxen in surface waters. *Environ. Sci. Technol.* **37**:1061-1068.

Truhaut, R., 1977, "Eco-Toxicology - Objectives, Principles and Perspectives", *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **1**(2):151-173.

Webb, S., Ternes, T., Gibert, M., Olejniczak, K., 2003. Indirect Human Exposure to Pharmaceuticals via Drinking Water. *Toxicol. Let.* **142**:157-167.

Weigel, S., Kuhlmann, J., Hühnerfuss, H., 2002. Drugs and personal care products as ubiquitous pollutants: occurrence and distribution of clofibric acid, caffeine and DEET in the North Sea. *Sci. Total Environ.* **295**:131-141.

Winkler, M., Lawrence, J. R., Neu, T. R., 2001. Selective degradation of Ibuprofen and Clofibric Acid in two model river biofilm systems. *Wat. Res.* **35**(13):3197-3205.

Xiao, X-Y., McCalley, D. V., McEvoy, J., 2001. Analysis of estrogens in river water and effluents using solid-phase extraction and gas chromatography-negative chemical ionisation mass spectrometry of the pentafluorobenzoyl derivatives. *Jour. of Chromat. A,* **923**:195-204.

Zuccato, E., Calamari, D., Natangelo, M., Fanelli, R., 2000. Presence of therapeutic drugs in the environment. *The Lancet* **335**:1789-1790.

Zwiener, C., Frimmel, F. H., 2000. Oxidative treatment of pharmaceuticals in water. *Wat. Res.* **34**(6):1881-1885.

Capítulo III

**Standard and autochthonous Cladocera:
acute and chronic effects of Diclofenac**

Standard and autochthonous Cladocera: acute and chronic effects of Diclofenac

João Joaquim^{1,2}; Catarina Marques²; Joana Pereira²; Fernando Gonçalves²

¹Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra, Instituto Politécnico de Coimbra, 3040-997
Coimbra, Portugal

²Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro, 3810-193 Aveiro, Portugal

Paper in draft form

1. Introduction

Nowadays, environmental quality has a major role in decision making worldwide and is receiving larger attention from the scientific community. In this way, environmental contamination by pharmaceutical chemicals can actually be faced as a potential risk for human health.

In the last 20-30 years the presence and the persistence of pharmaceuticals in different environmental compartments received a growing attention, and systematized and continuous information on the actual effects of these chemicals is available (Halling-Sørensen *et al.*, 1998; Fromme *et al.*, 1999; Heberer, 2002; Fent, 2003; Ashton *et al.*, 2004; Bendz *et al.*, 2005).

According to McBride and Wyckoff (2002), the higher sensitivity of the available analytical methods, and naturally the continuous increase of pharmaceuticals use, had a conspicuous contribution to the wide identification of low levels of pharmaceutical products in superficial water bodies and groundwater. Dietrich *et al.*, (2002) reported at least 60 pharmaceutical substances in aquatic systems, and Fent *et al.* (2006) refer 80-100 pharmaceuticals detected in recent studies; this highlights the relevance of research focused on the impact of these substances in non-target organisms inhabiting those systems.

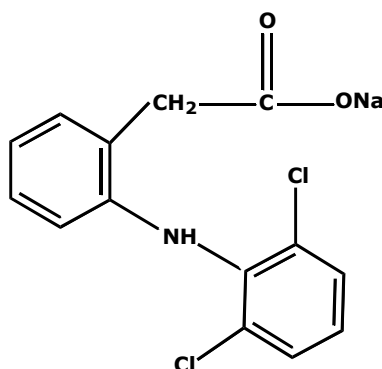
Some of these substances, even in low concentrations and/or being classified as non-persistent, can indeed be able to harm wildlife natural populations, due to their abundant and continuous use (McBride and Wyckoff, 2002). Due to its incomplete removal during the ordinary wastewater treatment processes, Non Steroidal Anti-inflammatory Drugs (NSAIDs) constitute an emerging class of environmental pollutants (Pérez-Estrada *et al.*, 2005a).

In humans, Diclofenac is rapidly converted into 4-hydroxydiclofenac, as major metabolite (Landsdorp *et al.*, 1990; Gilman, 1996).

It is the NSAID active substance of several medicines widely marketed in Portugal, (INFARMED, 2005), and all over Europe (Fent *et al.*, 2006).

Diclofenac (2-[(2,6-Dichlorophenyl)amino]benzeneacetic acid sodium salt) (CAS 15307-79-6, SIGMA, 2006a) (Figure 1) has a water solubility of 50 mg/mL (Pérez-Estrada *et al.*, 2005b; SIGMA, 2006b).

Fig. 1. Chemical structure of Sodium Diclofenac.



In fact, Diclofenac is one of the pharmacological substances most frequently detected in the water cycle (Pérez-Estrada *et al.*, 2005a). Moreover, STP (Sewage Treatment Plants) systems are inefficient on Diclofenac removal (Heberer *et al.*, 2002; Quintana *et al.*, Tauxe-Wuersch *et al.*, 2005), which favours its persistence within the aquatic system. Actually, the chemical was already found in groundwater samples (Heberer *et al.*, 1997; Sacher *et al.*, 2001), and, although rarely, in raw or treated drinking water (Heberer *et al.*, 2001).

Two species belonging to the genus *Daphnia* were selected for use in this study. As non-target organisms, *Daphnia* species are widely used in ecotoxicological assessments. These invertebrates have a short life-cycle and a small size, high fecundity rates, parthenogenetic reproduction, ubiquitous occurrence, and are easily handled in laboratory conditions (Koivisto, 1995). In addition, they are relevant representatives of the zooplankton community assuming a key-position in the aquatic food web, and have shown a relative higher sensitivity to xenobiotics when compared with other freshwater invertebrates (Mark and Solbé, 1998; Hanazato, 2001).

Due to these advantages, *Daphnia* has been widely used in short and long-term exposures to evaluate the effects in survival, growth, reproduction

of a wide range of chemicals (Martinez-Jerónimo, *et al.*, 2000; Knops *et al.*, 2001; Marques *et al.*, 2004a, b; Flaherty and Dodson, 2005). These organisms have actually been suggested as suitable to be used as an alternative to the use of mammals in preliminary evaluations related with the lethal toxicity of new chemicals (Guilhermino, 2000).

The present study intended to evaluate the acute and chronic effects (survival, growth and reproduction) of Sodium Diclofenac in two cladoceran species – the standard *Daphnia magna* and the indigenous *Daphnia longispina*. According to Rand and Petrocelli (1985), indigenous species, *i.e.* species which are representative of ecosystems receiving pollutants, should be used in toxicity testing. In most cases, such as that of Portugal and most of the southern-Europe countries, the widely used *D. magna* fails to meet this criterion. Hence, we focused on testing and comparing the sensitivity of *D. magna* and *D. longispina* in the present study. Moreover, the continuous input and, in some cases, the persistence of pharmaceuticals in water bodies is likely to promote a chronic exposure of the inhabiting organisms. In fact, there is a relevant lack of data in literature concerning chronic effects of pharmaceuticals (Fent *et al.*, 2006) and this work aims to contribute to generate relevant information on this particular issue.

2. Material and Methods

Daphnid Culture

Parental animals were reared in synthetic ASTM hardwater medium (ASTM, 1980) (hereinafter referred as ASTM) supplied with an organic additive extracted from the marine algae *Ascophillum nodosum* (Baird *et al.*, 1989). These bulk cultures were renewed every two days and the organisms were fed with *Pseudokirchneriella subcapitata*, which is cyclically cultured in the lab following Stein (1973), at a rate of 3.0×10^5 and 1.50×10^5 cell/ml for *Daphnia*

magna (clone A sensu Baird *et al.*, 1989) and for *D. longispina* (clone EM7 sensu Antunes *et al.*, 2003), respectively. The *Daphnia* cultures were maintained without aeration supply, under a 16^L:8^D photoperiod, and a temperature of 20 ± 1 °C.

Chemicals and Test Solutions

Diclofenac (purity >99%) was afforded from Sigma-Aldrich, (Steinheim, Germany). Stock solutions were prepared by dissolving the appropriate amounts of chemical into ASTM, and were stored at 4°C in dark. To comply with the test protocol requirements (OECD, 1998, 2000), pH was adjusted in the stock solutions, in order to keep the range 6-9 in all treatments. All the test solutions were freshly prepared immediately before each test routine.

Test procedures

Tests were performed in general accordance with the OECD guidelines (OECD, 1998, 2000). Only neonates from the third to fifth broods, and less than 24hrs-old were used in the tests, in order to minimize maternal effects (Barata and Baird, 1998). The incubation conditions were kept as described for the culture procedures.

The acute toxicity tests were carried out under geometric dilution series of Diclofenac-concentrated test solutions (within the range 41.44-200.00 mg/L for *D. magna*, and 18.86-200.00 mg/L for *D. longispina*) plus ASTM control. Four replicates with five animals each were used in each test treatment, and no food was provided. Dissolved oxygen (Oxi 330 WTW) and pH (pH 330 WTW) were monitored in the beginning and the end of the tests for validation purposes within the relative guideline. All vessels were checked for immobilised daphnids after each 48h-exposure period.

In the chronic toxicity tests the daphnids were individually exposed in 50mL-glass vessels, along 21 days, to six nominal concentrations of Diclofenac

and one ASTM control: 11.400, 17.100, 25.650, 38.475, and 57.713 mg/L for *D. magna*; and 1.250, 2.500, 5.000, 10.000 and 20.000 mg/L for *D. longispina*. The organisms were transferred to freshly prepared test solutions every other day. Dissolved oxygen and pH were monitored before each renewal for validation purposes. Food supply rates were kept in compliance with the protocol requirements (OECD, 1998, 2000) and the algae concentrations were kept similar to those used in the culture procedures. The tests were observed daily for eventual mortality and/or reproduction. When present, offspring were counted and then discarded. These records allowed the calculation of several reproductive endpoints: total number of neonates; number and size of broods; age at first reproduction. The size of the neonates of the first brood was also assessed by direct measurements under a stereoscope (Olympus SZX9). The body size of the tested females was extrapolated, in the beginning and the end of each test, from the moult exopodite length (Pereira *et al.*, 2004) (Olympus SZX9), allowing the estimation of the somatic growth rate (g sensu Burns, 2000):

$$g = [\ln(l_f) - \ln(l_0)] / \Delta t \text{ (day}^{-1}\text{)},$$

where l_f is the final body length (mm), l_0 is the initial body length (mm) and Δt is the time range (days).

The per capita rate of population increase (r , day⁻¹) was estimated by means of the Euler-Lotka equation:

$$\sum e^{-r \cdot x} \cdot l_x \cdot m_x = 1$$

where r stands for the per capita rate of population increase (day⁻¹), x for the age of class (days), l_x for the probability of surviving to age x (0... n), and m_x for the fecundity at age x . Uncertainties were estimated according to the Jackknife technique (Meyer *et al.*, 1986)

Data Analysis

The number of immobilized organisms, in each acute test, was plotted against the tested concentrations, and the 48h-EC₅₀s with the respective 95% confidence limits (CL) were calculated using the standard probit procedure (Finney, 1971). The No Observed Effect Concentration (NOEC) and Lowest Observed Effect Concentration (LOEC) were found for each reproductive and growth parameter, using a one-way ANOVA approach, followed by a Dunnett's multiple comparison test when applicable (Zar, 1996). A significance level of 0.05 was used in all the statistical analyses.

3. Results

Acute toxicity Tests

In the acute immobilisation tests, parameters, dissolved oxygen and pH were within the protocol requirements (OECD, 2000). Table 1 reports the 48h-immobilisation EC₅₀s for *D. magna* and *D. longispina*. *D. longispina* was markedly the most sensitive species to Diclofenac by presenting an EC₅₀ which was more than three times lower, than that found for *D. magna*. This difference, between species in the acute sensitivity to Diclofenac is reinforced by the strict inexistence of overlapping of confidence intervals.

Table 1
48h-EC₅₀ values (mg/L), with respective 95% confidence limits for *D. magna* and *D. longispina* (n = 20).

Species	EC ₅₀	Lower 95%CL	Upper 95%CL
<i>D. magna</i>	134.087	123.226	147.271
<i>D. longispina</i>	35.353	27.963	41.797

Chronic Toxicity Tests

The range of Diclofenac concentrations used in the chronic assays, for both species, was defined in order to achieve sublethal concentrations, and following the relative EC₅₀ previously found in the acute assays. Very low mortality rates were found: when considering the *D. magna* chronic assay, 20% and 10% mortality were recorded at 26.650 mg/L and 57.713 mg/L Diclofenac, respectively. No mortality was registered in any of the treatments used in the *D. longispina* test. Data obtained during the survival period of daphnids which died during the exposure period were only used for integration in the population growth rate-related calculations. Table 2 and 3 show, respectively, the statistical output of ANOVA and the NOEC and LOEC values relative to each of the analysed sub-lethal endpoints, for *D. magna* and *D. longispina*.

Table 2
Statistical results for sublethal endpoints in *D. magna* and *D. longispina*.

Specie	<i>D. magna</i>				<i>D. longispina</i>			
	df	MS _{residual}	F	P	df	MS _{residual}	F	P
Fecundity	5, 51	75,679	3,219	0,013	5, 54	40.598	7.913	0.000
Maturation	5, 51	0,426	2,119	0,078	5, 54	0.180	4.992	0.001
SGR	5, 51	8,24x10 ⁻⁶	2,838	0,025	5, 54	0.003	1.083	0.380
PGR (<i>r</i>)	5, 54	0,001	1,518	0,200	5, 54	0.000	2.665	0.032

SGR – Somatic Growth Rate; PGR (*r*) – Population Growth Rate; df – degrees of freedom – MS_{residual} – Residual Mean-Square; F – ANOVA F value; P – Probability

Table 3
NOECs and LOECs determined for sublethal endpoints in *D. magna* and *D. longispina*.

Endpoint	NOEC (mg/L)		LOEC (mg/L)	
	<i>D. magna</i>	<i>D. longispina</i>	<i>D. magna</i>	<i>D. longispina</i>
Fecundity	38.475	2.500	57.713	5.000
Maturation	11.400*	10.000	17.100*	2.500
PGR (<i>r</i>)	≥57.713	≥5.000	>57.713	>5.000
SGR	38.475	≥5.000	57.713	>5.000
Number of neonates of the 1 st brood	38.475	1.250	57.713	2.500
Size of N1 neonates	17.100	10.000	26.650	20.000

*No concentration-response relationship. PGR (*r*) - Population growth rate. (SGR) Somatic growth rate.

In figure 2 is detectable the decrease of fecundity in both tested species along the concentration range. The offspring yield by *D. magna* was significantly lower in the last concentration (57.713 mg/L) (table 2) when compared to the control treatment, following the decreasing pattern consistently shown along the concentration range. The *D. longispina* fecundity was more markedly affected by showing a significant decrease at the three highest tested concentrations: a NOEC of 2.5 mg/L and a LOEC of 5.0 mg/L were found (table 3), and a *ca.* 21% reduction, in the highest Diclofenac concentration (20 mg/L), should be noticed.

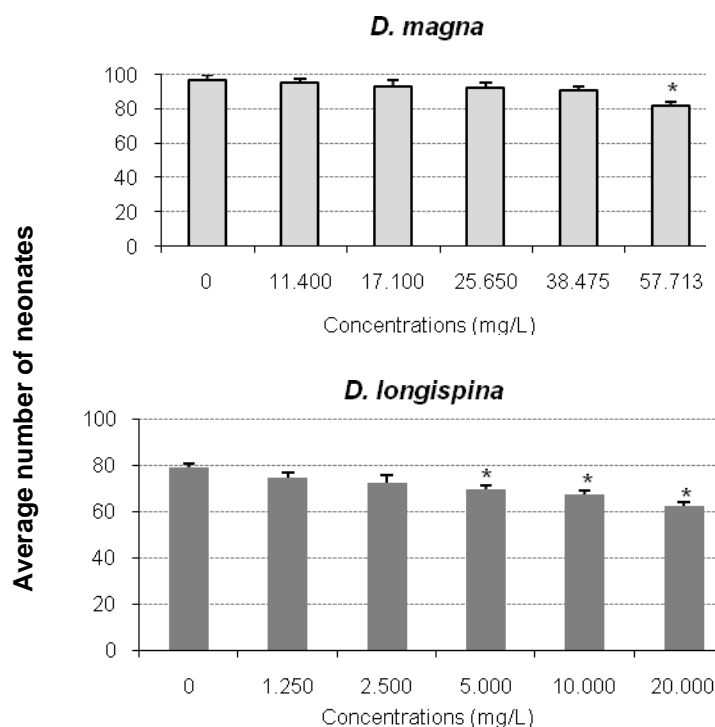


Fig. 2. Mean number of neonates yielded per female during the chronic test (21 days) by *D. magna* and *D. longispina*, at increasing concentrations of Diclofenac. Error bars represent the standard error, and * indicates a statistically significant difference relatively to control.

Following the trend observed for the net fecundity, the size of the first brood was also significantly reduced by Diclofenac in both daphnid species (Fig. 3; Table 2). In this parameter, statistically significant differences were recorded between the control and the highest concentration of Diclofenac, for *D. magna*, and between the control and the four higher concentrations of Diclofenac, for *D. longispina*. Diclofenac was more toxic to *D. longispina* than to *D. magna* when regarding this endpoint, and a maximal reduction of ca. 30% (relative to control) in the higher concentration was observed for the former species; NOEC and LOEC values found for *D. magna* were more than one order of magnitude higher than those found for *D. longispina*.

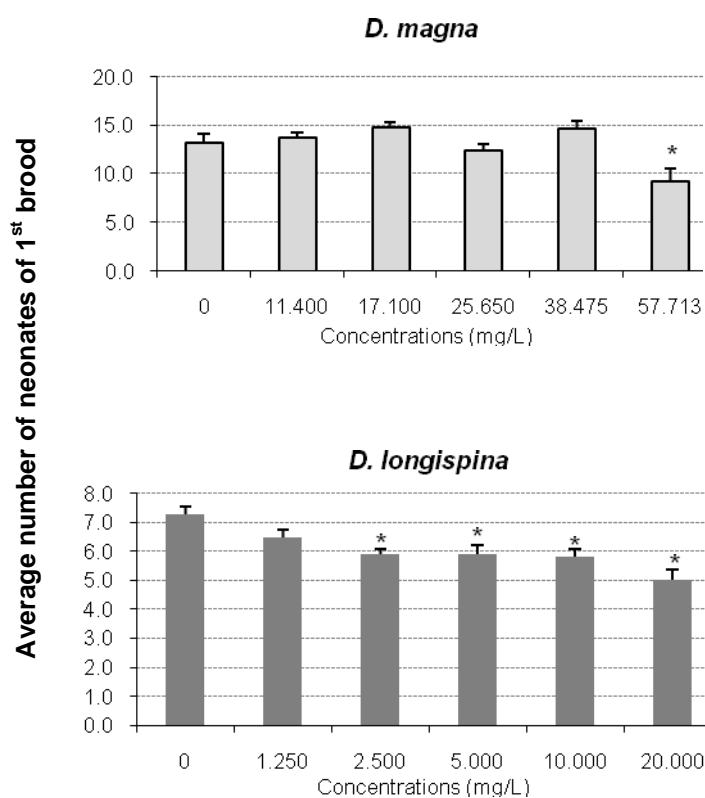


Fig. 3. Mean number of neonates yielded by each female in the first brood, during the chronic test (21 days) by *D. magna* and *D. longispina*, at increasing concentrations of Diclofenac. Error bars represent the standard error, and * indicates statistically significant difference relatively to control.

The size of the first brood neonates followed the trends previously observed for fecundity and the size of the first brood, *i.e.*, the size of the neonates was significantly impaired in both tested species (fig. 4; table 2). *D. magna* and *D. longispina* showed a similar range of sensitivity to Diclofenac regarding this endpoint (table 3), given the similar LOEC values found: 25.65mg/L and 20 mg/L for *D. magna* and *D. longispina*, respectively.

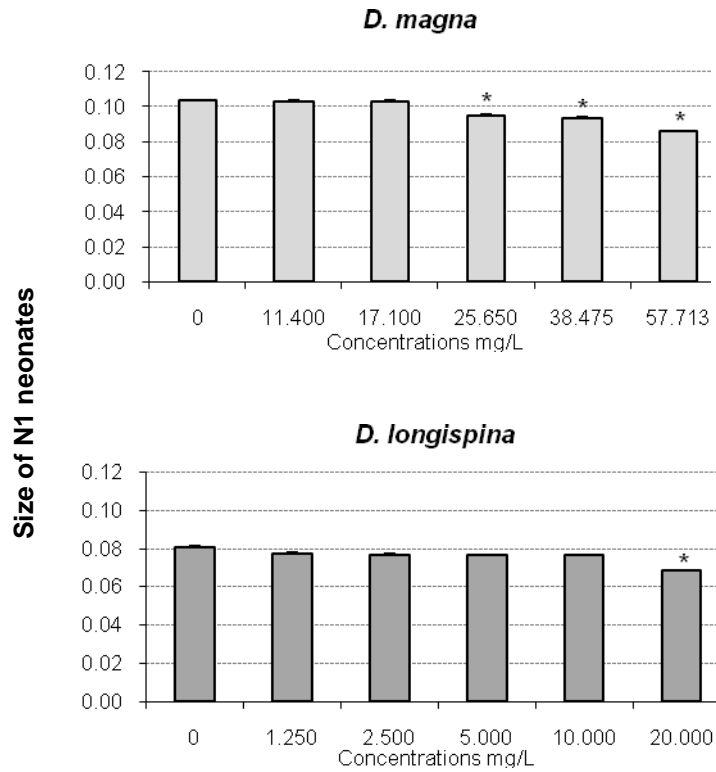


Fig. 4. Mean size of neonates of first brood, during the chronic test (21 days) by *D. magna* and *D. longispina*, at increasing concentrations of Diclofenac. Error bars represent the standard error, and * indicates statistically significant difference relatively to control.

As to the maturation of *D. magna*, there was not a linear dose-response relationship, and a statistically significant delay in maturation was only observed at 17.1 mg/L – Diclofenac. On the opposite, the maturation of *D. longispina* was significantly delayed by increasing concentrations of Diclofenac, following a liner dose-response pattern (Fig. 5).

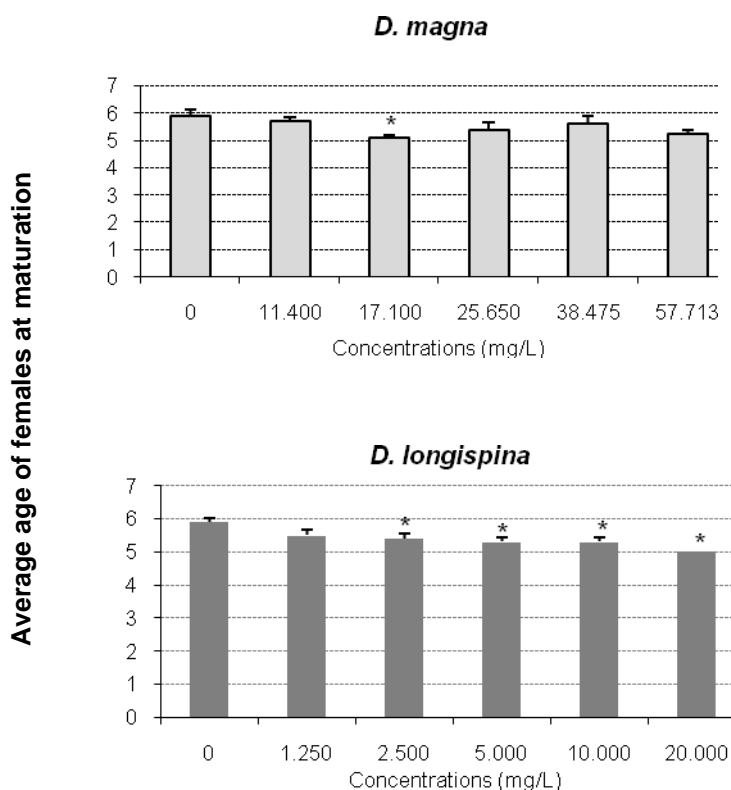


Fig. 5. *D. magna* and *D. longispina* age at maturation (day⁻¹) in increasing concentrations of Diclofenac. Error bars represent the standard error, and * indicates statistically significant difference relatively to control.

Using the population growth rate (r) as a response parameter, cumulative fecundity and survivorship records obtained during the 21 days of the exposure are integrated, producing a relevant measure of effects. Figure 6 and table 2 show that this parameter was not consistently affected by Diclofenac; the population growth rate of *D. magna* was not impaired by the toxicant; although without statistical significant, *D. longispina* denoted a slight reduction in r , mainly expressed in the higher Diclofenac concentration. In spite of this, ANOVA procedures relative to *D. longispina* have identified significant changes in response within the concentrations range, which were not assigned through the Dunnett test – this would be probably related with the existence of significant differences between toxicant-concentrated treatments instead of between control and toxicant-concentrated treatments.

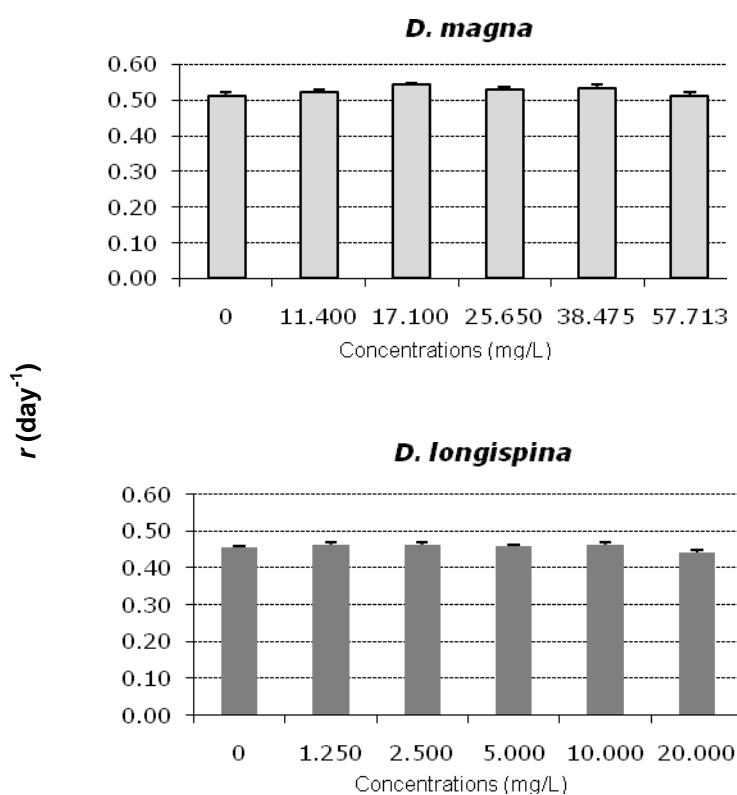


Fig. 6. Population Growth Rate (r) of *D. magna* and *D. longispina*, at increasing concentrations of Diclofenac. Error bars represent the standard error, and * indicates statistically significant difference relatively to control.

The somatic growth rate of *D. magna*, at the last concentration (57.713 mg/L), suffered a statistical significant reduction relatively to the control (Fig. 7), presenting a NOEC of 38.475 mg/L and a LOEC of 57.713 mg/L (table 3).

On the opposite, the exposure to Diclofenac did not affected the somatic growth rate of *D. longispina*, when considering the tested concentrations range (table 2); in spite of this, a slight decrease in the somatic growth is observable (Fig. 7).

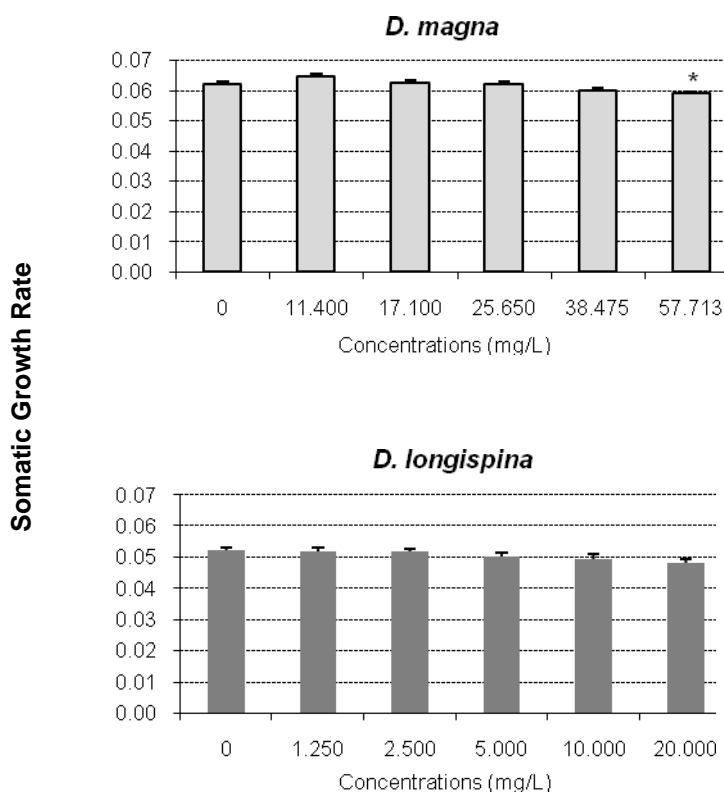


Fig. 7. Somatic Growth Rate (SGR) of *D. magna* and *D. longispina* at increasing concentrations of Diclofenac. Error bars represent the standard error, and * indicates a statistically significant difference relatively to control

4. Discussion

The present study provides evidences on the ability of Diclofenac to induce acute and chronic effects in two cladoceran species – *D. magna* and *D. longispina*.

D. longispina, the autochthonous species used in this study, was more sensitive to acute exposure of Diclofenac ($EC_{50} = 35.353$ mg/L) than was the standard species, *D. magna* ($EC_{50} = 134.087$ mg/L).

Substances that induce toxicity in aquatic organisms, can be classified using the relative EC_{50} value in different classes: (i) < 1 mg/L (very toxic to aquatic organisms); (ii) 1-10 mg/L (toxic to aquatic organisms) and (iii) 10-100 mg/L (harmful to aquatic organisms) (CEC, 1996). According to this classification, Diclofenac should be classified as harmful to the indigenous species used in this study (*D. longispina*).

Most available toxicity data refers to the acute effects of several pharmaceuticals. Notwithstanding, the incessant input and persistence of pharmaceuticals, though present in low levels that are unlikely to produce acute toxic effects, does not exclude the possibility that chronic effects may become apparent after many years (Jones *et al.*, 2001).

The results revealed a significant inhibition on fecundity (size of offspring) for *D. longispina*, when exposed to increasing concentrations of Diclofenac, but for *D. magna* was only obtained statistical significance in the last concentration tested (*ca.* 57 mg/L). In general, the chronic exposure to Diclofenac induced not only a decrease in normal reproduction, but also a delay in maturation for autochthonous daphnids. In *D. magna* maturation have not a linear dose-response relationship.

It is possible that the effects measured in fecundity, could be due to changes in feeding-rate or nutrition processes, from which daphnids allocate energy for self-maintenance. According to Trubetskova and Lampert (2002), this is a possible toxic effect on *Daphnia*, which can occur through a trend of decreasing energy supply, probably through feeding (*e.g.*, reduced ingestion or assimilation rates), - known as supply-side responses -, and an implied

increase in maintenance, known as demand-side responses - (Baird *et al.*, 1990).

In addition, there was a significant inhibition of the first brood size and the size of N1 neonates, for both species. These responses contradict the available data of *Daphnia* populations under stress conditions (e.g., low food levels, exposure to a xenobiotic). In fact, *Daphnia* under stress produce fewer but larger offspring (Coors *et al.*, 2004; Pieters and Liess, 2006).

Baird *et al.*, (1991), refer that sodium bromide and 3,4-Dichloroaniline (3,4-DCA) affect the developing eggs in the brood chamber and Trubetskova and Lampert (2002) refer that 3,4-DCA reduced the total number of eggs produced only moderately, but induced strong egg mortality in particular in the first brood. In our study, the reduced number of neonates in the first brood could possibly be due to a similar effect induced by Diclofenac. Furthermore, under exposure to Diclofenac, daphnids may allocate the energy for self-maintenance, reducing the number of offspring and the size of neonates. Ultimately, this small size of neonates may induce more sensitiveness to toxicants.

According to Forbes and Calow (1999), the population growth rate (r) can be a better parameter to measure responses to toxicants when compared with individual-level endpoints because it integrates potentially complex interactions among life-history traits (e.g., survival, reproductive output, age at each brood). In particular, it has been recommended as a superior laboratory toxicological endpoint compared to the acute mortality because it combines lethal and sublethal effects into one meaningful measure (Stark *et al.*, 1997). Although a statistically significant outcome occurred for the fecundity and maturation endpoints, either *D. magna* or *D. longispina* population growth rate was not significantly reduced under Diclofenac exposures. For the somatic growth rate parameter *D. magna* was the species presenting a significant reduction under the highest concentration of Diclofenac. On the contrary the autochthonous species growth was not an affected endpoint.

Although the tested concentrations are higher, in comparison with the values that is usually found in the different studies, in wastewaters residues

and in superficial and groundwater. Usually, the concentration in aquatic environments is about ng/L-µg/L concentration range (Buser *et al.*, 1998; Ternes, 1998; Hirsch *et al.*, 1999; Stumpf *et al.*, 1999; Farré *et al.*, 2001; Sacher *et al.*, 2001; Sedlak and Pinkston, 2001; Heberer, 2002).

However if it is true that the effective concentrations found in the aquatic environment occur at much lower levels, it is a risk if we do not put the possibility that cumulative, imperceptible effects may be induced on non-target organisms when they are continuously exposed to inputs in their natural environment. In fact, aquatic organisms are particularly important targets, as they are exposed via wastewater residues over their whole life (Fent *et al.*, 2006).

Drugs are designed to act in humans and achieve a pharmacological effect and according to Barry and Stoopman, (2000), *Daphnia* sp. is provided with receptor systems that are similar to those of vertebrate species, over which pharmaceuticals act on. In fact, because of that, pharmaceuticals and their metabolites residues may have the potential to provoke changes upon physiological and/or morphological functions of daphnids, which effects can be ultimately showed after long periods of chronic exposure, that overcome the considered test period. In fact, probably, it would be interesting to assess the effect of pharmaceuticals at a lower organizational level (*e.g.*, molecular, biochemical and enzyme activity level), in order to detect first warning responses to changes in normal living conditions (Zhang *et al.*, 2004). An experiment conducted by Schwaiger *et al.*, (2004), in which rainbow trout was exposed to Diclofenac over a 28-day period, have confirmed that occur histopathological alterations (kidney and gills) and showed a concentration-related accumulation. The highest amounts were detected in the liver, followed by the kidney; the gills and the muscle tissue. This put in evidence the ability of Diclofenac to induce toxic effects in a low organizational level, though the study refers to higher trophic levels.

Comparing the responses of *D. magna* and *D. longispina* it is quite clear that *D. longispina* was more sensitive not only to acute Diclofenac, but also to chronic exposures, while *D. magna* showed to be more resistant in the individual endpoints. Body size and weight could be one of several suggestions

to explain those differences between both species, in fact, Hanazato and Hirokawa (2001) referred that the sensibility of daphnids to a chemical compound is negatively correlated with its body size, in a linear regression. Koivisto *et al.*, (1992) suggested that the large size of *D. magna* may increase its tolerance to toxic substances compared to smaller cladocerans and other zooplankton species. *D. magna* also has a life-history strategy different from that of the smaller cladoceran species which live in lakes.

Overall autochthonous species seem to provide a more ecologically relevant understanding of behavior under conditions of chronic environmental exposure, including exposure to a constant input of pharmaceuticals.

5. Conclusion

Diclofenac, as an active substance with pharmacological effect for humans, generally impairs in the survivorship, reproduction and growth of the two cladoceran species used in this study – *D. magna* and *D. longispina*. However, the concentration levels used to produce these effects in acute and chronic tests are much higher, if we compare with the concentration levels detected in the aquatic environment.

In acute toxicity tests, *D. magna* seems to be more tolerant to acute toxicity ($EC_{50} = 134.087$ mg/L) and we found more sensibility to Diclofenac in *D. longispina* ($EC_{50} = 35.353$ mg/L).

In the chronic exposure, *D. longispina* showed to be more sensitive on the fecundity and maturation endpoints. Lower concentrations of Diclofenac inhibit the number of neonates, and promote the delay in the age of *D. longispina* females at maturation, relatively to *D. magna*. On the other hand, in comparison to *D. longispina*, *D. magna* was more affected in somatic growth rate.

In conclusion, Diclofenac affect more *D. longispina* at individual-level endpoints (fecundity and maturation), in opposite to *D. magna*, where fecundity is impaired and the somatic growth rate is slightly, but significantly affected in the last concentration tested.

6. References

American Society for Testing and Materials (ASTM), 1980. Standard Practice for Conducting Acute Toxicity Tests with Fishes, Macroinvertebrates and Amphibians, Report E-729-80. ASTM, Philadelphia.

Ashton, D., Hilton, M., Thomas, K. V., 2004. Investigating the environmental transport of human pharmaceuticals to streams in the United Kingdom. *Sci. Tot. Envir.* **333**:167-184.

Baird, D. J., Barber, I., Bradley, M., Calow, P., Soares, A. M. V. M., 1989. The *Daphnia* bioassay: a critique. *Hydrobiologia* **188/189**:403-406.

Baird, D. J., Barber, I., Calow, P., 1990. Clonal variation in general responses of *Daphnia magna* Strauss to toxic stress. I. chronic life-history effects. *Funct. Ecol.* **4**:399-407.

Baird, D. J., Barber, I. Soares, A. M, V. M., Calow, P., 1991. An early life-stage test with *Daphnia magna* Strauss: an alternative to the 21-day chronic test? *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **22**:1-7.

Barata C., Baird D.J. 1998. Phenotypic plasticity and constancy life-history traits in laboratory clones of *Daphnia magna* effects of neonatal length. *Funct Ecol* **12**:442- 452.

Barry, M. J., Stoopman, C., 2000. A review of the effects of endocrine disrupting chemicals on freshwater zooplankton with particular reference to *Daphnia*. *Asian J. Energy Environ.* **1**:195-212.

Bendz, D., Paxéus, N. A., Ginn, T. R., Loge, F. J., 2005. Occurrence and fate of pharmaceutically active compounds in the environment, a case study: Höje River in Sweden. *Journal of Hazardous Materials* **122**:195-204.

Buser, H. R., Poiger, T., Müller, M. D., 1998. Occurrence and fate of the pharmaceutical drug diclofenac in surface waters: rapid photodegradation in a lake. *Environ. Sci. Technol.* **32**(22):3449–3456.

Cleuvers, M., 2004. Mixture toxicity of the anti-inflammatory drugs diclofenac, ibuprofen, naproxen, and acetylsalicylic acid. *Ecotoxicol. and Envir. Saf.* **59**: 309-315.

Commission of the European Communities (CEC). 1996. Technical guidance document in support of commission directive 93/67/EEC on risk assessment for new notified substances and commission regulation (EC) No 1488/94 on risk assessment for existing substances. Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg.

Coors, A., Hammers-Wirtz, M., Ratte, H. T., 2004. Adaptation to environmental stress in *Daphnia magna* simultaneously exposed to a xenobiotic. *Chem.* **56**:395-404.

Dietrich, D. R., Webb, S. F., Petry, T., 2002. Hot spot pollutants: pharmaceuticals in the environment. *Toxicol. Let.* **131**: 1-3.

Farré, M. L., Ferrer, I., Ginebreda, A., Figueras, M., Olivella, L., Tirapu, L., Vilanova, M., Barcelo, D., 2001. Determination of drugs in surface water and wastewater samples by liquid chromatography–mass spectrometry: methods and preliminary results including toxicity studies with *Vibrio fischeri*. *J. Chromatogr.* **A938**(1/2): 187–197.

Fent, K., 2003. Ecotoxicological problems associated with contaminated sites. *Tox. Let.* **140-141**:353-365.

Fent, K., Weston, A. A., Caminada, D., 2006. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology* **76**: 122–159.

Finney, D. J., 1971. Probit Analysis. 3rd Ed. Cambridge University Press, Cambridge.

Flaherty, C. M., Dodson, S. I., 2005. Effects of pharmaceuticals on *Daphnia* survival, growth, and reproduction. *Chemosphere*, **61**: 200-207.

Forbes, V. E., Calow, P., 1999. Is the per capita rate of increase a good measure of population-level effects in ecotoxicology? *Envir. Toxicol. Chem.* **18**:1544-1556.

Fromme, H., Otto, T., Pilz, K., Neugebauer, F., 1999. Levels of synthetic musks: Bromocyclene and PCBs in eel (*Anguilla Anguilla*) and PCBs in sediment samples from some waters of Berlin/Germany. *Chemosp.* **39**:1723-1735.

Gilman, Alfred, ed. lit. - Goodman & Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica. 9^a ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, cop. 1996. XXI, 1436 p. ISBN 970-10-1161.

Guilhermino, L., Diamantino, T., Silva, M. C., Soares, A. M. V. M., 2000. Acute Toxicity Test with *Daphnia magna*: An Alternative to Mammals in the Prescreening of Chemical Toxicity?. *Ecotox. and Environ. Safety* **46**:357-362.

Halling-Sørensen, B., Nielsen, S. N., Lanzky, P. F., Ingerslev, F., Holten Lützhøft, H. C., Jørgensen, S.E., 1998. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment – a review. *Chemosphere* **36**(2):357-393.

Hanazato, T., 2001. Pesticide effects on freshwater zooplankton: an ecological Perspective. *Env. Pol.* **112**:1-10.

Hanazato, T., Hirokawa, H., 2001. Sensitivity of *Daphnia pulex* of different ages to the insecticide carbaryl. *Jpn. J. Environ. Toxicol.*, **4**(2):67-72.

Heberer, T. 2002. Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. *Tox. Lett.* **131**:5-17.

Heberer, T., Dünnbier, U., Reilich, C., Stan, H. J., 1997. Detection of drugs and drug metabolites in groundwater samples of a drinking water treatment plant. *Fresenius Environ. Bull.* **6**:438–443.

Heberer, T., Fuhrmann, B., Schmidt-Bäumler, K., Tsipi, D., Koutsouba, V., Hiskia, A., 2001. Occurrence of pharmaceutical residues in sewage, river, ground and drinking water in Greece and Germany. In: Daughton, C.G., Jones-Lepp, T. (Eds.), *Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment: Scientific and Regulatory Issues*. American Chemical Society, Washington, DC, pp. 70–83.

Heberer, T., Reddersen, K., Mechlinski, A., 2002. From municipal sewage to drinking water: Fate and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment in urban areas. *Water Sci. Technol.* **46**(3):81–88.

Hirsch, R., Ternes, T., Haberer, K., Kratz, K-L., 1999. Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. *Sci. Total Environ.* **225**:109-118.

Instituto Nacional da Farmácia e do Medicamento (INFARMED), 2005. Estatística do Medicamento 2004. INFARMED, Lisboa, Portugal.

Jones O. A. H., Voulvoulis, N., Lester J. N., 2001. Human pharmaceuticals in the aquatic environment: a review. *Environ. Technol.* **22**: 1383–1395.

Knops, M., Altenburger, R., Segner, H., 2001. Alterations of physiological energetics, growth and reproduction of *Daphnia magna* under toxicant stress. *Aquatic Toxic.* **53**:79-90.

Koivisto, S., Ketola, M., Walls, M., 1992. Comparison of five cladoceran species in short- and long-term copper exposure. *Hydrobiologia*, **248**:125-36.

Koivisto, S., 1995. Is *Daphnia magna* an Ecologically representative zooplankton species in toxicity tests?. *Env. Pol.* **90**(2):263-267.

Landsdorp, D., Vree, T. B., Janssen, T. J., Guelen, P. J., 1990. Pharmacokinetics of rectal Diclofenac and its hydroxy metabolites in man. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol.* **28**:298–302.

Mark, U., Solbé, J., 1998. Analysis of the ECETOC Aquatic Toxicity (EAT) database V – The relevance of *Daphnia magna* as a representative test species. *Chem.* **36**(1):155-166.

Marques, C. R., Abrantes, N., Gonçalves, F., 2004a. Life-History Traits of Standard and Autochthonous Cladocerans: II. Acute and Chronic Effects of Acetylsalicylic Acid Metabolites. *Environ. Toxicol.* **19**(5):527-540.

Marques, C. R., Abrantes, N., Gonçalves, F., 2004b. Life-history traits of standard and autochthonous cladocerans: I. Acute and chronic effects of acetylsalicylic acid. *Environ. Toxicol.* **19**(5):518-526.

McBride, M., Wyckoff, J., 2002 Emerging Liabilities from Pharmaceuticals and Personal Care Products. *Environ. Claims Journal* **14**(2): 175-189.

Meyer, J. S., Ingersoll, C. G., Mc Donald, L. L., Boyce, M. S., 1986. Estimating uncertainty in population growth rates: Jackknife vs. Bootstrap techniques. *Ecology* **67**:1156-1166.

OECD, 1998. *Daphnia magna* Reproduction Test. Guidelines for Testing of Chemicals, nº 211, Organization for Economic Cooperation and Development.

OECD, 2000. *Daphnia* sp., Acute Immobilisation Test. Guidelines for Testing of Chemicals, nº 202, Organization for Economic Cooperation and Development.

Pereira, J. L., Marques, C. R., Gonçalves, F., 2004. Allometric relations for *Ceriodaphnia* spp and *Daphnia* spp. *Annales de Limnologie - International Journal of Limnology* **40**(1):11-14.

Pérez-Estrada, L.A., Maldonado, M.I., Gernjak, W., Agüera, A., Fernandez-Alba, A.R., Ballesteros, M.M., Malato, S., 2005a. Decomposition of diclofenac by solar driven photocatalysis at pilot plant scale. *Catalysis Today* **101**:219-226

Pérez-Estrada, L. A., Malato, S., Gernjak, W., Agüera, A., Thurman, E. M., Ferrer, I., Fernandes-Alba, A. R., 2005b. Photo-Fenton Degradation of Diclofenac: Identification of Main Intermediates and Degradation Pathway. *Environ. Sci. Technol.* **39**:8300-8306.

Pieters, B. J., Liess, M., 2006. Maternal nutritional state determines the sensitivity of *Daphnia magna* offspring to short-term Fenvalerate exposure. *Aq. Tox.* **76**:268-277.

Quintana, J. B., Weiss, S., Reemtsma, T., 2005. Pathways and metabolites of microbial degradation of selected acidic pharmaceutical and their occurrence in municipal wastewater treated by a membrane bioreactor. *Wat. Res.* **39**:2654-2664.

Rand, G. M., Petrocelli, S. R., 1985. Introduction. In *Fundamentals of Aquatic Toxicology*, ed. G. M. Rand & S. R. Petrocelli. Hemisphere Publishing Corporation, Washington, USA, pp. 1-29.

Sacher, F., Lange, F. T., Brauch, H-J., Blankenhorn, I., 2001. Pharmaceuticals in groundwaters - Analytical methods and results of a

monitoring program in Baden-Württemberg, Germany. *Journ. of Chrom.* **938**:199-210.

Schwaiger, J., Ferling, H., Mallow, U., Wintermayr, H., Negele, R. D., 2004. Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug Diclofenac. Part I: histopathological alterations and bioaccumulation in rainbow trout. *Aq. Tox.* **68**:141-150.

Sedlak, D.L., Pinkston, K.E., 2001. Factors affecting the concentrations of pharmaceuticals released to the aquatic environment. *Wat. Res. Update,* **120**:56-64.

SIGMA, 2006a. Folha de Dados de Segurança do Produto (MSDS). Atualizado em 11 Fevereiro 2006. Sigma-Aldrich Sucursal em Portugal.

SIGMA, 2006b. D6899 Diclofenac Sodium Salt – Properties (Solubility) Sigma-Aldrich, St. Louis – Missouri, United States of America. Disponível em <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/ProductDetail/SIGMA/D6899>.

Stark, J. D., Tanigoshi, L., Bounfour, M., Antonelli, A., 1997. Reproductive potential: Its influence on the susceptibility of a species to pesticides. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **37**:273–279.

Stein, J. R., 1973. Handbook of Phycological Methods: Culture Methods and Growth Measurements. Cambridge. University Press, London, Uk, 7-24.

Stumpf, M., Ternes, T. A., Wilken, R. D., Rodrigues, S. V., Baumann, W., 1999. Polar drug residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Sci. Total Environ.* **225**, 135-141.

Taxe-Wuersch, A., De Alencastro, L. F., Grandjean, D., Tarradellas, J., 2005. Occurrence of several acidic drugs in sewage treatment plants in Switzerland and risk assessment. *Wat. Res.* **39**:1761-1772.

Ternes, T.A., 1998. Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water Res.* **32** (11):3245–3260.

Trubetskova, I., Lampert, W., 2002. The juvenile growth rate of *Daphnia*: a short-term alternative to measuring the per capita rate of increase in ecotoxicology? *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **42**:193-198.

Zhang, J. F., Sun, Y. Y., Shen, H., Liu, H., Wang, X. R., Wu, J. C., Xue, Y. Q., 2004. Antioxidant response of *Daphnia magna* exposed to no. 20 diesel oil. *Chem. Spec. Bioavailab.* **16**(4):139-144.

Zar, J. H., 1996. Biostatistical Analysis. 3rd Ed. Prentice-Hall, Inc., USA, 662pp.

Capítulo IV

Discussão Geral

Neste estudo foi possível integrar e promover a comparação de possíveis efeitos tóxicos em organismos padrão (*D. magna*) e autóctones (*D. longispina*), através de testes de toxicidade aguda e crónica, com a substância activa Diclofenac Sódico, uma substância bastante comercializada (Jones *et al.*, 2002; Huschek *et al.*, 2004; Fent *et al.*, 2006). Promoveu-se, com este estudo, a utilização de uma abordagem de avaliação, considerada pouco explorada (Fent *et al.*, 2006) e onde ainda existe algum défice de dados – a exposição crónica de organismos aquáticos.

Foi possível observar, através dos ensaios ecotoxicológicos realizados com esta substância farmacológica, a indução de efeitos agudos e crónicos, nos organismos de teste.

Os ensaios agudos a que foram submetidas ambas as espécies, evidenciaram efeitos de imobilização, com valores de concentração da substância activa inferiores para *D. longispina*, a espécie autóctone. As concentrações que provocaram um efeito em 50% da população exposta (CE₅₀), permitiram, por isso, evidenciar uma maior sensibilidade da espécie autóctone, tendo em conta que o valor de CE₅₀ medido, é inferior, cerca de quatro vezes, ao valor identificado para a espécie padrão, *D. magna*.

Nos ensaios crónicos, a fecundidade de ambos os cladóceros diminuiu significativamente. A idade à maturação só é significativamente reduzida em *D. longispina*. O crescimento somático (Somatic Growth Rate), só tem impacto significativo para *D. magna*, na última concentração testada, não afectando *D. longispina*. O crescimento populacional (Population Growth Rate), tanto da espécie padrão, como da espécie autóctone não sofreu alterações sob exposição às concentrações de Diclofenac testadas.

Foi descrito por Baird *et al.*, (1991) que os compostos não actuam todos da mesma forma: podendo alguns penetrar a carapaça da mãe, afectando os ovos no ovário, enquanto outros podem, indirectamente, influenciar a fecundidade ao inibir o crescimento da fêmea. No nosso estudo, o tamanho dos juvenis da primeira ninhada foi inversamente proporcional ao aumento das concentrações do Diclofenac, de forma significativa. Embora nesse estudo

os xenobióticos testados fossem o Brometo de Sódio e 3,4-Dicloroanilina (DCA), regista-se a possibilidade de que o efeito do Diclofenac se possa ter manifestado durante o período de formação dos ovos. Trubetskova e Lampert (2002), referem mesmo, que DCA reduz o número total de ovos produzidos de uma forma modera, mas que induz elevada mortalidade dos ovos, em particular na primeira ninhada.

Daphnia é um organismo cuja sobrevivência, actividade e reprodução são asseguradas pela energia normalmente fornecida pelo alimento. Este facto induz que qualquer stress químico seja passível de alterar as taxas de ingestão ou assimilação, ou ainda, que possa afectar a sobrevivência do organismo, podendo alterar o normal processo de alocação de energia, nomeadamente, na reprodução, influenciando o desempenho e fecundidade das fêmeas (Baird *et al.*, 1990).

De um modo geral, *D. magna* mostrou-se mais tolerante ao Diclofenac, quer em exposições agudas, quer crónicas. De acordo com Lilius *et al.*, (1995), alguns estudos permitiram identificar que *D. magna* apresenta uma maior tolerância aos tóxicos, tendo em conta que o seu maior tamanho representa uma razão área de superfície/volume inferior, comparativamente com espécies menores (*e.g.*, *D. pulex*). Hanazato e Hirokawa (2001) demonstraram que a sensibilidade dos dafnídeos a uma substância química é negativamente correlacionável com o tamanho do corpo, numa regressão linear, o que explicam através do equilíbrio estabelecido entre a taxa de incorporação do xenobiótico e respectiva taxa de destoxificação, sendo que esta é condicionada pela quantidade de enzimas destoxicantes presentes nos animais. Esta explicação deixa pressupor que indivíduos de maior tamanho e massa corporal, poderão ser *a priori* mais tolerantes quando comparados com animais de menor dimensão.

Tendo em conta as espécies estudadas, a acumulação de compostos tóxicos por *D. magna*, poderá ser proporcionalmente menor à de *D. longispina*, tornando-a desse modo menos sensível à acção de xenobióticos, sendo uma possível justificação para os resultados obtidos no nosso estudo.

Esta situação remete-nos para outro tipo de estudos, para além dos tradicionalmente realizados (*e.g.*, fecundidade, crescimento, mortalidade),

sendo necessária uma análise a nível bioquímico e da fisiologia celular, de forma a identificar e caracterizar, em maior profundidade, os alvos e os efeitos deste tipo de substâncias farmacêuticas nos organismos aquáticos. Flaherty e Dodson, (2005) referem a associação que foi feita, entre a capacidade de *Daphnia* para se adaptar a um ambiente de stress químico e a indução de enzimas P-450, envolvidas no processo de destoxificação.

Não subsistindo grande dúvida que *D. magna* é um excelente organismo teste para estudar a toxicidade relativa de substâncias é possível perceber que estes estudos podem ter pouca capacidade de relação com o que se passa no ambiente. Segundo Koivisto (1995) para se adquirir mais conhecimento, sobre o potencial dano ecológico, será necessário estudar também as respostas de espécies que têm papéis essenciais nestas comunidades e desenvolver sistemas de teste que melhor correspondam ao que se passa no ambiente.

No caso do Diclofenac, e dos Anti-inflamatórios Não Esteróides (AINEs) no geral, o seu mecanismo de acção está associado às prostaglandinas, cuja existência em dafnídeos não foi possível identificar na literatura consultada. Em humanos, os AINEs actuam por inibição das ciclooxigenase-1 (COX-1) e ciclooxigenase-2 (COX-2), sendo que a ciclooxigenase é a enzima responsável pela biossíntese das prostaglandinas (Gilman, 1996). As prostaglandinas, intervêm em diversos processos fisiológicos e patológicos, em resposta imunológica e inflamatória, (Park *et al.*, 2001), estando descrita a sua formação numa variedade de vertebrados, *e.g.* peixes, anfíbios e aves, bem como em invertebrados, *e.g.*, corais, moluscos, crustáceos e insectos (Song e Brash, 1991). Assim, para as substâncias farmacêuticas com este mecanismo de acção, justificam-se estudos que permitam identificar a produção de prostaglandinas em dafnídeos, para tentar perceber outros mecanismos envolvidos na actuação deste grupo de medicamentos, nestes organismos não-alvo.

Neste estudo foi possível, para uma única substância, identificar efeitos crónicos e agudos, em duas espécies aquáticas, *D. magna* e *D. longispina*. Pese embora as concentrações testadas estarem muito acima dos limites normalmente identificados no ambiente, que se situam em valores que variam

entre 6 ng/L e 1.03 µg/L (Ternes, 1998; Stumpf *et al.*, 1999; Heberer *et al.*, 2002; Weigel *et al.*, 2002; Webb *et al.*, 2003; Ferrari *et al.*, 2004), a possibilidade de a longo prazo, poderem ocorrer alterações subtis a um nível de organização biológico inferior (*e.g.*, enzimático) deve ser tida em conta, e cuja acumulação pode ainda traduzir-se em efeitos fisiológicos e morfológicos profundos (Daughton e Ternes, 1999).

Um outro aspecto, importante mas talvez insuficiente do ponto de vista da realidade no ambiente, é a utilização de espécies autóctones que permitam uma melhor compreensão do comportamento individual e populacional de organismos sujeitos a condições desfavoráveis no seu ambiente natural.

É importante ainda, que na análise de risco ambiental, de compostos não regulamentados, com testes agudos, sejam integrados também testes crónicos que permitam uma avaliação mais diluída no tempo, já que essas exposições a longo prazo podem promover alterações no ciclo de vida dos organismos, comprometendo deste modo o equilíbrio dos ecossistemas aquáticos (Marques, 2003).

Um outro ponto interessante, pode ser a realização de estudos de toxicidade, comparativos, entre as substâncias activas dos medicamentos e os próprios medicamentos na forma de comercialização. Mendes *et al.*, (2004) descrevem diferenças de toxicidade, em *D. magna*, entre um herbicida, - o propanil -, e a sua forma comercial.

Tendo em conta o que foi descrito anteriormente, importa realizar estudos em animais de nível trófico superior, onde possam ser identificados os mecanismos de acção destas substâncias farmacêuticas e como produzem os seus efeitos tóxicos, devendo-se ainda promover a realização estudos que possam simular o ambiente natural, onde factores como a mistura das substâncias, a bioacumulação e biomagnificação podem ter um papel importante no comportamento e nos efeitos efectivos das substâncias em organismos não-alvo.

Referências Bibliográficas

American Society for Testing and Materials (ASTM), 1980. Standard Practice for Conducting Acute Toxicity Tests with Fishes, Macroinvertebrates and Amphibians, Report E-729-80. ASTM, Philadelphia.

Ankley, G. T., Black, M. C., Garric, J., Hutchinson, T. H., Iguchi, T., 2005. A framework for assessing the hazard of pharmaceutical materials to aquatic species. Chapter 6, Richard T. Williams (ed.), Human Pharmaceuticals: Assessing the Impacts on Aquatic Ecosystems. *Society of Environmental Toxicology and Chemistry*, Pensacola, FL, 183-237.

Antunes, S. C., (2001) Variabilidade clonal de respostas crônicas de *Daphnia longispina* a diferentes níveis alimentares. Departamento de Biologia. Aveiro. Aveiro, Portugal. Mestrado. 71pp.

Antunes, S. C., Castro, B. B., Gonçalves, F., 2004. Effect of food level on the acute and chronic responses of daphnids to lindane. *Env. Pol.* **127**:367-375.

Ayscough, N. J., Fawell, J., Franklin, G., Young, W., 2000. Review of Human Pharmaceuticals in the Environment. UK Environmental Agency, Bristol.

Ashton, D., Hilton, M., Thomas, K.V., 2004. Investigating the environmental transport of human pharmaceuticals to streams in the United Kingdom. *Sci. Total Envir.* **333**:167-184.

Baird, D. J., Barber, I., Bradley, M., Calow, P., Soares, A. M. V. M., 1989. The *Daphnia* bioassay: a critique. *Hydrobiologia* **188/189**:403-406.

Baird, D. J., Barber, I., Calow, P., 1990. Clonal variation in general responses of *Daphnia magna* Strauss to toxic stress. I. chronic life-history effects. *Funct. Ecol.* **4**:399-407.

Baird, D. J., Barber, I. Soares, A. M, V. M., Calow, P., 1991. An early life-stage test with *Daphnia magna* Strauss: an alternative to the 21-day chronic test? *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **22**:1-7.

Banks, J. E., Stark, J. D., 1998 - What Is Ecotoxicology? An Ad-Hoc Grab Bag or an Interdisciplinary Science?. *Integ. Biol.* **1**(5):195-204.

Barata C., Baird D. J. 1998. Phenotypic plasticity and constancy life-history traits in laboratory clones of *Daphnia magna* effects of neonatal length. *Funct Ecol* **12**:442- 452.

Baronti, C., Curini, R., d'Ascenzo, G., Di Corcia, A., Gentili, A., Samperi, R., 2000. Monitoring natural and synthetic estrogens at activated sludge sewage treatment plants and in a receiving river water. *Environ. Sci. Technol.* **34**(24):5059-5066.

Barry, M. J., Stoopman, C., 2000. A review of the effects of endocrine disrupting chemicals on freshwater zooplankton with particular reference to *Daphnia*. *Asian J. Energy Environ.* **1**:195-212.

Bendz, D., Paxéus, N. A., Ginn, T. R., Loge, F. J., 2005. Occurrence and fate of pharmaceutically active compounds in the environment, a case study: Höje River in Sweden. *Journal of Hazardous Materials* **122**:195-204.

Boxall, A. B. A., 2004. The environmental side effects of medication. European Molecular Biology Organization - EMBO reports **5**(12):1110-1116.

Brain, R. A., Johnson, D. J., Richards, S. M., Sanderson, H., Sibley, P. K., Solomon, K. R., 2004. Effects of 25 pharmaceutical compounds to Lemna

gibba using a seven-day static-renewal test. *Environ. Toxicol. Chem.*, **23**(2):371–382.

Brun, G. L., Bernier, M., Losier, R., Doe, K., Jackman, P., Lee, H-B., 2006. Pharmaceutical active compounds in Atlantic Canadian Sewage Treatment Plant effluents and receiving waters, and potential for environmental effects as measured by acute and chronic aquatic toxicity. *Environ. Toxicol and Chem.* **25**(8): 2163-2176.

Buser, H. R., Poiger, T., Müller, M. D., 1998. Occurrence and fate of the pharmaceutical drug diclofenac in surface waters: rapid photodegradation in a lake. *Environ. Sci. Technol.* **32**(22):3449–3456.

Chapman, P. M., 2002. Integrating toxicology and ecology: putting the “eco” into ecotoxicology. *Marine Pollut. Bullet.* **44**:7-15.

Christensen, F. M., 1998. Pharmaceuticals in the environment – A Human Risk?. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* **28**:212-221.

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

Cleuvers, M., 2004. Mixture toxicity of the anti-inflammatory drugs diclofenac, ibuprofen, naproxen, and acetylsalicylic acid. *Ecotoxicol. and Envir. Saf.* **59**:309-315.

Coors, A., Hammers-Wirtz, M., Ratte, H. T., 2004. Adaptation to environmental stress in *Daphnia magna* simultaneously exposed to a xenobiotic. *Chem.* **56**:395-404.

Crane, M., Watts, C., Boucard, T., 2006. Chronic aquatic environmental risks from exposure to human pharmaceuticals. *Sci. Total Envir.* **367**:23-41.

CSTEE, 2001. Opinion on: Draft CPMP Discussion Paper on Environmental Risk Assessment of Medicinal Products for Human Use [Non-Genetically Modified Organism (Non-GMO) Containing]. C2/JCD/csteeop/CPMPpaperRAssessHumPharm12062001/D(01), 24th CSTE Plenary Meeting, Brussels, 12 June 2001. Disponível em http://ec.europa.eu/food/fs/sc/sct/out111_en.pdf.

Cunningham, V. L., Buzby, M., Hutchinson, T., Mastrocco, F., Parke, N., Roden, N., 2006. Effects of Human Pharmaceuticals on Aquatic Life: Next Steps How do human pharmaceuticals get into the environment, and what are their effects?. American Chemical Society. *Envir. Sci. & Technol.* **40**:3457-3462.

Daughton, C. G., 2003. Cradle-to-Cradle Stewardship of Drugs for Minimizing Their Environmental Disposition While Promoting Human Health. II Drug Disposal, Waste Reduction and Future Directions. *Environ. Health Perspect.* **111**(5):75-785.

Daughton, C.G., Jones-Lepp, T., (Eds.), 2001. Pharmaceuticals and personal care products in the environment scientific and regulatory issues. Symposium Series 791, *American Chemical Society*, Washington DC, 56-69.

Daughton, C. G., Ternes, T. A., 1999. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change? *Environ. Health Perspect.* **107**: 907-938.

Dietrich, D. R., Webb, S. F., Petry, T., 2002. Hot spot pollutants: pharmaceuticals in the environment. *Toxicol. Let.* **131**:1-3.

Drillia, P., Stamatelatou, K., Lyberatos, L., 2005. Fate and mobility of pharmaceuticals in solid matrices. *Chemosphere* **60**:1034-1044.

Dzialowski, E. M., Turner, P. K., Brooks, B. W., 2005. Physiological and Reproductive Effects of Beta Adrenergic Receptor Antagonists in *Daphnia magna*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **50**:503–510.

Farré, M.L., Ferrer, I., Ginebreda, A., Figueras, M., Olivella, L., Tirapu, L., Vilanova, M., Barcelo, D., 2001. Determination of drugs in surface water and wastewater samples by liquid chromatography–mass spectrometry: methods and preliminary results including toxicity studies with *Vibrio fischeri*. *J. Chromatogr.* **A938**(1/2):187–197.

Fent, K., 2003. Ecotoxicological problems associated with contaminated sites. *Tox. Let.* **140-141**:353-365.

Fent, K., Weston, A. A., Caminada, D., 2006. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology* **76**:122–159.

Ferrando, M. D., Sancho, E., Andreu-Molner, E., 1999. Toxicity studies of tetradifon to *Daphnia magna*. *Ecotox. And Envir. Restoration*, **2**(1):14-18

Ferrari, B., Mons, R., Vollat, B., Fraysse, B., Paxéus, N., Lo Giudice, R., Pollio, A., Garric, J., 2004. Environmental risk assessment of six human pharmaceuticals: Are the current environmental risk assessment procedures sufficient for the protection of the aquatic environment. *Environ. Tox. Chem.* **23**(5):1344-1345.

Finney, D. J., 1971. Probit Analysis. 3rd Ed. Cambridge University Press, Cambridge.

Flaherty, C. M., Dodson, S. I., 2005. Effects of pharmaceuticals on *Daphnia* survival, growth, and reproduction. *Chemosphere*, **61**:200-207.

Forbes, V. E., Calow, P., 1999. Is the per capita rate of increase a good measure of population-level effects in ecotoxicology? *Envir. Toxicol. Chem.* **18**:1544-1556.

Frayse, B., Noury, P., Mons, R., Garric, J., 2003. Danio rerio: a tool for ecotoxicity assessment of pharmaceuticals. CEMAGREF. ENVIRPHARMA-Lyon-april 14/16 - 2003.

Fromme, H., Otto, T., Pilz, K., Neugebauer, F., 1999. Levels of synthetic musks: Bromocyclene and PCBs in eel (*Anguilla Anguilla*) and PCBs in sediment samples from some waters of Berlin/Germany. *Chemosp.* **39**:1723-1735.

Gierse, J. K., Koboldt, C. M., Walker, M. C., Seibert, K., Isakson, P. C., 1999. Kinetic basis for selective inhibition of cyclo-oxygenases. *Biochem. J.* **339**(Pt3):607-614.

Gilman, Alfred, ed. lit. - Goodman & Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica. 9ª ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, cop. 1996. XXI, 1436 p. ISBN 970-10-1161.

Guilhermino, L., Diamantino, T., Silva, M. C., Soares, A. M. V. M., 2000. Acute Toxicity Test with *Daphnia magna*: An Alternative to Mammals in the Prescreening of Chemical Toxicity?. *Ecotox. and Environ. Safety* **46**:357-362.

Halling-Sørensen, B., Nielsen, S. N., Lanzky, P. F., Ingerslev, F., Holten Lützhøft, H. C., Jørgensen, S.E., 1998. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment - a review. *Chemosphere* **36**(2):357-393.

Han, G. H., Hur, H. G., Kim, S. D., 2006. Ecotoxicological risk of pharmaceuticals from wastewater treatment plants in Korea: occurrence and toxicity to *Daphnia magna*. *Environ. Tox. Chem.*, **25**(1):265-271.

Hanazato, T., 2001. Pesticide effects on freshwater zooplankton: an ecological Perspective. *Env. Pol.* **112**:1-10.

Hanazato, T., Hirokawa, H., 2001. Sensitivity of *Daphnia pulex* of different ages to the insecticide carbaryl. *Jpn. J. Environ. Toxicol.*, **4**(2):67-72.

Heberer, T. 2002. Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. *Tox. Lett.* **131**:5-17.

Heberer, T., Dünnebier, U., Reilich, C., Stan, H. J., 1997. Detection of drugs and drug metabolites in groundwater samples of a drinking water treatment plant. *Fresenius' Environ. Bull.* **6**:438-443.

Heberer, T., Feldman, D., 2005. Contribution of effluents from hospitals and private households to the total loads of diclofenac and carbamazepine in municipal sewage effluents - modeling versus measurements. *Jour. Haz. Mat.* **122**:211-218.

Heberer, T., Fuhrmann, B., Schmidt-Bäumler, K., Tsipi, D., Koutsouba, V., Hiskia, A., 2001. Occurrence of pharmaceutical residues in sewage, river, ground and drinking water in Greece and Germany. In: Daughton, C.G., Jones-Lepp, T. (Eds.), *Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment: Scientific and Regulatory Issues*. American Chemical Society, Washington, DC, pp. 70-83.

Heberer, T., Reddersen, K., Mechlinski, A., 2002. From municipal sewage to drinking water: Fate and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment in urban areas. *Water Sci. Technol.* **46**:81-88.

Hilton, M. J., Thomas, K. V., Ashton, D., 2003. Targeted Monitoring Programme for Pharmaceuticals in the Aquatic Environment. R&D Technical Report P6-012/06/TR. Environment Agency.

Hirsch, R., Ternes, T., Haberer, K., Kratz, K-L., 1999. Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. *Sci. Total Environ.* **225**:109-118.

Hutchinson, T. H., Pounds, N. A., Hampel, M., Williams, T.D., 1999. Impact of natural and synthetic steroids on the survival, development and reproduction of marine copepods (*Tisbe battagliai*). *Sci. Total Envir.* **233**:167-179.

Instituto Nacional da Farmácia e do Medicamento (INFARMED), 2000. Estatística do Medicamento 1999. INFARMED, Lisboa, Portugal.

Instituto Nacional da Farmácia e do Medicamento (INFARMED), 2002. Estatística do Medicamento 2001. INFARMED, Lisboa, Portugal.

Instituto Nacional da Farmácia e do Medicamento (INFARMED), 2003. Estatística do Medicamento 2002. INFARMED, Lisboa, Portugal.

Instituto Nacional da Farmácia e do Medicamento (INFARMED), 2004. Estatística do Medicamento 2003. INFARMED, Lisboa, Portugal.

Instituto Nacional da Farmácia e do Medicamento (INFARMED), 2005. Estatística do Medicamento 2004. INFARMED, Lisboa, Portugal.

Instituto Nacional da Farmácia e do Medicamento (INFARMED), 2006. Prontuário Terapêutico on-line 6ª Ed. INFARMED, Lisboa, Portugal. Disponível em <http://www.infarmed.pt/prontuario/index.php>.

Jones O. A. H., Voulvoulis, N., Lester J. N., 2001. Human pharmaceuticals in the aquatic environment: a review. *Environ. Technol.* **22**:1383-1395.

Jones, O. A. H., Voulvoulis, N., Lester J. N., 2002. Aquatic environmental assessment of the top 25 English prescription pharmaceuticals. *Wat. Res.*, **36**: 5013-5022.

Jonhson, A. C., Belfroid, A. Di Corcia, A., 2000. Estimating steroid oestrogen inputs into activated sludge treatment works and observations on their removal from the effluent. *Sci. Total Environ.* **225**:163-173.

Jørgensen, S. E., Halling-Sørensen, B., 2000. Drugs in the environment. *Chemosphere* **40**:691-699.

Knops, M., Altenburger, R., Segner, H., 2001. Alterations of physiological energetics, growth and reproduction of *Daphnia magna* under toxicant stress. *Aquatic Toxic.* **53**:79-90.

Koivisto, S., Ketola, M., Walls, M., 1992. Comparison of five cladoceran species in short- and long-term copper exposure. *Hydrobiologia*, **248**:125-36.

Koivisto, S., 1995. Is *Daphnia magna* an Ecologically representative zooplankton species in toxicity tests?. *Env. Pol.* **90**(2):263-267.

Kolpin, D. W., Furlong, E. T., Meyer, M. T., Thurman, E. M., Zaugg, S. D., Barber, L. B., Buxton, H. T., 2002. Pharmaceuticals, Hormones, and Other Organic Wastewater Contaminants in U.S. Streams, 1999-2000: A National Reconnaissance. *Environ. Sci. Technol.* **36**:1202-1211.

Kosjek, T., Heath, E., Krbavčič, A. 2005. Determination of non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAIDs) residues in water samples. *Environ. Intern.* **31**:679-685.

Kümmerer, K. (Ed.), 2001. Pharmaceuticals in the Environment. Sources, Fate, Effects and Risk. Springer, Berlin, Germany.

Kümmerer, K., Al-Ahmada, A., Bertram, B., Wießler, M., 2000. Biodegradability of antineoplastic compounds in screening tests: influence of glucosidation and of stereochemistry, *Chemosphere* **40**:767-773.

Kümpel, T., Alexy, R., Kümmerer, K., 2001. What do we know about antibiotics in the environment? In: Pharmaceuticals in the environment. Kümmerer K (Ed.) Berlin, Springer, 2001.

Kurumbail, R. G., Stevens, A. M., Gierse, J. K., McDonald, J. J., Stegeman, R. A., Pak, J. Y., Gildehaus, D., Miyashiro, J. M., Penning, T. D., Seibert, K., Isakson, P. C., Stallings, W. C., 1997. Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. *Nature* **384**(6610):644-648.

Landsdorp, D., Vree, T. B., Janssen, T. J., Guelen, P. J., 1990. Pharmacokinetics of rectal Diclofenac and its hydroxy metabolites in man. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol.* **28**:298–302.

Leeuwangh, P., 1978. Toxicity Tests with Daphnids: It's Application in the Management of Water Quality. *Hydrobiologia.* **59**(2):145-148.

Mark, U., Solbé, J., 1998. Analysis of the ECETOC Aquatic Toxicity (EAT) database V – The relevance of *Daphnia magna* as a representative test species. *Chem.* **36**(1):155-166.

Marques, C. R., 2003. Efeitos tóxicos do ácido acetilsalicílico e seus principais metabolitos em espécies padrão e autóctones. Departamento de Biologia. Aveiro. Aveiro, Portugal. Mestrado. 97pp.

Marques, C. R., Abrantes, N., Gonçalves, F., 2004a. Life-History Traits of Standard and Autochthonous Cladocerans: II. Acute and Chronic Effects of Acetylsalicylic Acid Metabolites. *Environ. Toxicol.* **19**(5):527-540.

Marques, C. R., Abrantes, N., Gonçalves, F., 2004b. Life-history traits of standard and autochthonous cladocerans: I. Acute and chronic effects of acetylsalicylic acid. *Environ. Toxicol.* **19**(5):518-526.

Martínez-Jerónimo, F., Espinosa-Chávez, Félix., Villaseñor, R., 2000. Effect of Culture Volume and Adult Density on the Neonate Production of *Daphnia magna*, as a Test Organism for Aquatic Toxicity Tests. *Envir. Tox.* **15**(3):155-155.

McBride, M., Wyckoff, J., 2002 Emerging Liabilities from Pharmaceuticals and Personal Care Products. *Environ. Claims Journal* **14**(2):175-189.

Mendes, C. D., Pereira, J. L., Gonçalves, F., 2007. Acute and chronic effects of STAM NOVEL FLO[®] (commercial solution) and its active ingredient Propanil in *Daphnia magna*. *Fres. Envir. Bull.* **16**(5):537-542.

Meyer, J. S., Ingersoll, C. G., Mc Donald, L. L., Boyce, M. S., 1986. Estimating uncertainty in population growth rates: Jackknife vs. Bootstrap techniques. *Ecology* **67**:1156-1166.

Michels, E., Leynem, M., Cousyn, C., De Meester L., Ollevier, F., 1999. Phototactic behavior of *Daphnia* as a tool in the continuous monitoring of water quality: Experiments with a positively phototactic *Daphnia magna* clone. *Wat. Res.* **33**(2):401-408.

Miranda, C. D., Castillo, G., 1998. Resistance to antibiotic and heavy metals of motile aeromonads from Chilean freshwater. *Sci Total Environ.* **224**:167-176.

Nogueira, A. J. A., Baird, D. J., Soares, A. M, V, M., 2004. Testing physiologically-based resource allocation rules in laboratory experiments with *Daphnia magna* Straus. *Ann. Limnol. – Int. J. Lim.* **40**(4):257-267.

Nunes, B., Carvalho, F., Guilhermino, L., 2004. Acute and chronic effects of clofibrate and clofibric acid on the enzymes acetylcholinesterase, lactate dehydrogenase and catalase of the mosquitofish, *Gambusia holbrooki*. *Chemosphere*, **57**:1581-1589.

Nunes B., Carvalho F., Guilhermino L., 2005. Acute toxicity of widely used pharmaceuticals in aquatic species: *Gambusia holbrooki*, *Artemia parthenogenetica* and *Tetraselmis chunii*. *Ecotox. and Environ. Saf.* **61**(3):413-419.

OECD, 1998. *Daphnia magna* Reproduction Test. Guidelines for Testing of Chemicals, nº 211, Organization for Economic Cooperation and Development.

OECD, 2000. *Daphnia* sp., Acute Immobilisation Test. Guidelines for Testing of Chemicals, nº 202, Organization for Economic Cooperation and Development.

Park, J-W., Choi, Y. J., Suh, S-I., Kwon, T. K., 2001. Involvement of ERK and Protein Tyrosine Phosphatase Signaling Pathways in EGCG-Induced Cyclooxygenase-2 Expression in Raw 264.7 Cells. *Bioch. and Bioph. Res. Com.* **286**:721-725

Parkkonen, J., Larsson, D. G. J., Adolfsson-Erici, M., Pettersson, M., Berg, A. H., Olsson, P-E., Förlin, L., 2000. Contraceptive pill residues in sewage effluent estrogenic to fish. *Marine Env. Res.* **50**:191-199.

Pedibhotla, V. K, Sarath, G., Sauer, J. R., Stanley-Samuels, D. W., 1995. Prostaglandin biosynthesis and subcellular-localization of prostaglandin-H synthase activity in the lone star tick, *Amblyomma americanum*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **25**(9):1027-1039.

Penning, T. D., Talley, J. J., Bertenshaw, S. R., Carter, J. S., Collins, P. W., Docter, S., Graneto, M. J., Lee, L. F., Malecha, J. W., Miyashiro, J. M., Rogers, R. S., Rogier, D. J., Yu, S. S., Anderson, G. D., Burton, E. G.,

Cogburn, J. N., Gregory, S. A., Koboldt, C. M., Perkins, W. E., Seibert, K., Veenhuizen, A. W., Zhang, Y. Y., Isakson, P. C., 1997. Synthesis and biological evaluation of the 1,5-diarylpyrazole class of cyclooxygenase-2 inhibitors: identification of 4-5-(4-methylphenyl)-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazol-1-yl benzenesulfonamide (SC-58635 Celecoxib). *J. Med. Chem.* **40**(9):1347–1365.

Pereira, J. L., Marques, C. R., Gonçalves, F., 2004. Allometric relations for *Ceriodaphnia spp* and *Daphnia spp*. *Annales de Limnologie - International Journal of Limnology* **40**(1):11-14.

Pérez-Estrada, L.A., Maldonado, M.I., Gernjak, W., Agüera, A., Fernandez-Alba, A.R., Ballesteros, M.M., Malato, S., 2005a. Decomposition of diclofenac by solar driven photocatalysis at pilot plant scale. *Catalysis Today* **101**:219-226

Pérez-Estrada, L. A., Malato, S., Gernjak, W., Agüera, A., Thurman, E. M., Ferrer, I., Fernandes-Alba, A. R., 2005b. Photo-Fenton Degradation of Diclofenac: Identification of Main Intermediates and Degradation Pathway. *Environ. Sci. Technol.* **39**:8300-8306.

Pieters, B. J., Liess, M., 2006. Maternal nutritional state determines the sensitivity of *Daphnia magna* offspring to short-term Fenvalerate exposure. *Aq. Tox.* **76**:268-277.

Plano Nacional Contra as Doenças Reumáticas, 2004 – Direcção Geral da Saúde, Lisboa.

Poiger, T., Buser, H. R., Muller, M. D., 2001. Photodegradation of the pharmaceutical drug diclofenac in a lake: Pathway, field measurements, and mathematical modeling. – *Environ. Toxicol. Chem.* **20**:256-263.

Quinn, B., Gagné, F., Costello, M., McKenzie, C., Wilson, J., Mothersill, C., 2004. The endocrine disrupting effect of municipal effluent on the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Aq. Toxic.* **66**:279-292.

Quintana, J. B., Weiss, S., Reemtsma, T., 2005. Pathways and metabolites of microbial degradation of selected acidic pharmaceutical and their occurrence in municipal wastewater treated by a membrane bioreactor. *Wat. Res.* **39**:2654-2664.

Rand, G. M., Petrocelli, S. R., 1985. Introduction. In *Fundamentals of Aquatic Toxicology*, ed. G. M. Rand & S. R. Petrocelli. Hemisphere Publishing Corporation, Washington, USA, pp. 1-29.

RCM, 2004. Resumo das Características do Medicamento - Voltaren®. Parte IB. Novartis Farma – Produtos Farmacêuticos, S.A., Rio de Mouro, Portugal. 24 de Agosto de 1994.

Reynolds, K. A., 2003. Pharmaceuticals in Drinking Water Supplies. **45(6)**: Disponível em <http://www.wcponline.com/column.cfm?T=T&ID=2199>.

Sacher, F., Lange, F. T., Brauch, H-J., Blankenhorn, I., 2001. Pharmaceuticals in groundwaters - Analytical methods and results of a monitoring program in Baden-Württemberg, Germany. *Journ. of Chrom.* **938**:199-210.

Schröder, A., Heß, O.; Matthies, M; Scharenberg, B.; Schmidt, R., 2002. Human pharmaceuticals in surface waters of the Elbe river basin - emission, fate and exposure assessment. 12th Annual Meeting of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC) Europe, Vienna, May 12 – 16. Disponível em <http://www.usf.uni-osnabrueck.de/projects/GREAT-ER/elberhine/pharma.pdf>.

Schwab, B. W., Hayes, E. P., Fiori, J. M., Mastrocco, F. J., Roden, N. M. Cragin, Meyerhoff, R. D., D'Aco, V. J., Anderson, P. D., 2005. Human pharmaceuticals in US surface waters: A human health risk assessment. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* **42**:296-312.

Schwaiger, J., Ferling, H., Mallow, U., Wintermayr, H., Negele, R. D., 2004. Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug Diclofenac. Part I: histopathological alterations and bioaccumulation in rainbow trout. *Aq. Tox.* **68**:141-150.

Sedlak, D.L., Pinkston, K.E., 2001. Factors affecting the concentrations of pharmaceuticals released to the aquatic environment. *Wat. Res. Update,* **120**:56-64.

SIGMA, 2006a. Folha de Dados de Segurança do Produto (MSDS). Atualizado em 11 Fevereiro 2006. Sigma-Aldrich Sucursal em Portugal.

SIGMA, 2006b. D6899 Diclofenac Sodium Salt – Properties (Solubility) Sigma-Aldrich, St. Louis – Missouri, United States of America. Disponível em <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/ProductDetail/SIGMA/D6899>.

Song, W. C., Brash, A. R., 1991. Purification of an allene oxide synthase and identification of the enzyme as a cytochrome-P-450. *Science* **253**(5021):781-784.

Stan, H. J., Heberer, T., 1997. Pharmaceuticals in the environment. *Analysis Magazine* **25**:20-23.

Stark, J. D., Tanigoshi, L., Bounfour, M., Antonelli, A., 1997. Reproductive potential: Its influence on the susceptibility of a species to pesticides. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **37**:273–279.

Stein, J. R., 1973. Handbook of Psychological Methods: Culture Methods and Growth Measurements. Cambridge. University Press, London, Uk, 7-24.

Stuer-Lauridsen, F., Birkved, M., Hansen, I. P., Holten Lützhøft, H.-C., Halling-Sørensen, B., 2000. - Environmental risk assessment of human pharmaceuticals in Denmark after normal therapeutic use. *Chem.* **40**:783-793.

Stumpf, M., Ternes, T. A., Wilken, R. D., Rodrigues, S. V., Baumann, W., 1999. Polar drug residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Sci. Total Environ.* **225**:135-141.

Taxe-Wuersch, A., De Alencastro, L. F., Grandjean, D., Tarradellas, J., 2005. Occurrence of several acidic drugs in sewage treatment plants in Switzerland and risk assessment. *Wat. Res.* **39**:1761-1772.

Ternes, T. A., 1998. Occurrence of Drugs in German Sewage Treatment Plants and Rivers. *Wat. Res.* **32**(11):3245-3260.

Ternes, T. A., 2001. Analytical methods for the determination of pharmaceuticals in aqueous environmental samples. *Trends Anal. Chem.* **20**:419-434.

Ternes, T.A., Bonerz, M., Schmidt, T., 2001. Determination of neutral pharmaceuticals in wastewater and rivers by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr.* **A938**:175/185.

Ternes, T. A., Stumpf, M., Mueller, J., Haberer, K., Wilken, R-D., Servos, M., 1999. Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants - I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. *Sci. Total Envir.* **225**:81-90.

Thomas, P. M., Foster, G. D., 2004 - Determination of Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs, Caffeine, and Triclosan in Wastewater by Gas Chromatography–Mass Spectrometry. *Jour. Environ. Sci. Health.* **A39(8):**1969-1978.

Tixier, C., Singer, H. P., Oellers, S., Müller, S. R., 2003. Occurrence and Fate of Carbamazepine, Clofibric Acid, Diclofenac, Ibuprofen, Ketoprofen, and Naproxen in Surface Waters. *American Chemical Society,* **37(6):**1061-1068.

Trubetskova, I., Lampert, W., 2002. The juvenile growth rate of *Daphnia*: a short-term alternative to measuring the per capita rate of increase in ecotoxicology? *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **42:**193-198.

Truhaut, R., 1977, "Eco-Toxicology - Objectives, Principles and Perspectives", *Ecotoxicology and Environmental Safety,* **1(2):**151-173.

Vane, J. R., Botting, R. M., 1998. Mechanism of action of anti-inflammatory drugs. *Int. J. Tissue React.* **20(1):**3–15.

Webb, S., Ternes, T., Gibert, M., Olejniczak, K., 2003. Indirect Human Exposure to Pharmaceuticals via Drinking Water. *Toxicol. Let.* **142:**157-167.

Weigel, S., Kuhlmann, J., Hühnerfuss, H., 2002. Drugs and personal care products as ubiquitous pollutants: occurrence and distribution of clofibric acid, caffeine and DEET in the North Sea. *Sci. Total Environ.* **295:**131-141.

Winkler, M., Lawrence, J. R., Neu, T. R., 2001. Selective degradation of Ibuprofen and Clofibric Acid in two model river biofilm systems. *Wat. Res.* **35(13):**3197-3205.

Xiao, X-Y., McCalleya, D. V., McEvoyb, J., 2001. Analysis of estrogens in river water and effluents using solid-phase extraction and gas

chromatography–negative chemical ionisation mass spectrometry of the pentafluorobenzoyl derivatives. *Jour. of Chromat. A*, **923**:195-204.

Zhang, J. F., Sun, Y. Y., Shen, H., Liu, H., Wang, X. R., Wu, J. C., Xue, Y. Q., 2004. Antioxidant response of *Daphnia magna* exposed to no. 20 diesel oil. *Chem. Spec. Bioavailab.* **16**(4):139-144.

Zar, J. H., 1996. Biostatistical Analysis. 3rd Ed. Prentice-Hall, Inc., USA, 662pp.

Zargarzadeh, A. H., Tavakoli, N., Hassanzadeh, A., 2005. A Survey on the Extent of Medication Storage and Wastage in Urban Iranian Households. *Clinical Therapeutics* , **27**(6):970-978.

Zuccato, E., Calamari, D., Natangelo, M., Fanelli, R., 2000. Presence of therapeutic drugs in the environment. *The Lancet* **335**:1789-1790.

Zwiener, C., Frimmel, F. H., 2000. Oxidative treatment of pharmaceuticals in water. *Wat. Res.* **34**(6):1881-1885.