ISSN: 2594-6153

Diclofenaco interfere no desenvolvimento embriolarval de ouriços do mar?

Juliana Andrade de Sousa[1]; Rafaela Amaral Gomes dos Santos[1], Fabio Hermes Pusceddu[1], Luciane Alves Maranho[2]

[1]Universidade Santa Cecília (UNISANTA), Santos-SP, Brasil
[2]Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP), Campus Guarujá, Guarujá-SP, Brasil
E-mail: julianaandradesousa@gmail.com

Resumo: As propriedades físico-químicas dos fármacos não são removidas totalmente pelo tratamento de águas residuais convencional, podendo gerar efeitos adversos em organismos marinhos. Testes de toxicidade crônica foram realizados com o fármaco diclofenaco, por ser um dos anti-inflamatórios mais utilizado mundialmente, e que acarreta efeitos adversos diversos conhecidos sobre a saúde humana, mas poucos conhecidos em organismos marinhos. Este estudo teve como objetivo verificar em laboratório a toxicidade crônica do diclofenaco a embriões de ouriço do mar *Echinometra lucunter*, sendo expostos a concentrações do fármaco:1,56 mg/L; 3,12 mg/L; 6,25 mg/L; 12,5 mg/L, 25 mg/L; 50 mg/L e 100 mg/L. Diclofenaco foi tóxico causando desenvolvimento embriolarval anormal em concentrações acima de 25 mg/L. A comprovação de sua toxicidade é de extrema importância, para que seja regulamentada normas que monitorem e preservem o ecossistema marinho, já que este é um fármaco amplamente utilizado.

Palavras-Chave: Diclofenaco; Ouriço do mar; Toxicidade crônica.

Does diclofenac dnterfere with the embriolarval development of sea drchins?

Abstract: The physicochemical properties of drugs are not completely removed by conventional wastewater treatment, which can have adverse effects on marine organisms. Chronic toxicity tests were carried out with the drug diclofenac, o it is one of the most used worldwide anti-inflammatory drugs in the world, and it causes several known adverse effects on human health, but few known in marine organisms. This study aimed to verify in the laboratory the chronic toxicity of diclofenac to sea urchin embryos *Echinometra lucunter*, being exposed to concentrations of the drug: 1.56 mg / L; 3.12 mg / L; 6.25 mg / L; 12.5 mg / L, 25 mg / L; 50 mg / L and 100 mg / L. Diclofenac was toxic causing abnormal embriolarval development at concentrations above 25 mg / L. Proof of its toxicity is of utmost importance, in order to regulate standards that monitor and preserve the marine ecosystem, since this is a widely used drug.

Keywords: Diclofenac; Sea urchin; Chronic toxicity.

Introdução: Os fármacos são substâncias complexas [1], seu acúmulo causa efeitos tóxicos que contribuem para a contaminação ambiental [2]. O fármaco no ambiente marinho se transforma em um xenobiótico para o organismo aquático, acarreta bioacumulação com probabilidade de causar efeitos deletérios através de absorção direta do ambiente, ou indiretamente através do alimento contaminado [3], podendo interferir em processos bioquímicos e fisiológicos do ciclo de vida da espécie marinha[4]. O organismo marinho

através de suas vias de exposição, como respiração, nutrição e epiderme, absorve os contaminantes por suas mucosas e membranas, que após absorvido são dissolvidos e atravessam o epitélio branquial, sendo transportado pelo sangue através de tecidos altamente vascularizados até atingir tecidos de reserva que não são comumente monitoradas no ambiente, mas com potencial para entrar nele e causar efeitos adversos, efeitos esses sobre a saúde humana conhecidos, mas pouco explorados em organismos marinhos [5]. O Fármaco em estudo é o diclofenaco, fórmula química $C_{14}H_{11}CL_2NO_2$, log 4,51, Pka 4,15. É um anti-inflamatório quimicamente heterogêneo, que modula ou reduz o processo inflamatório, com o objetivo de diminuir a inflamação e a dor, interromper ou retardar a progressão da doença pertence ao Grupo AINES (anti-inflamatórios não esteroidais), são inibidores da ciclooxigenase não seletivo, tem ação farmacológica relacionada com a inibição da Cox 1 e 2, inibindo deste modo a produção de Prostaglandina e Tromboxano. A Cox é uma enzima constitutiva, que se encontra na maioria dos tecidos e nas plaquetas, tem função de manutenção no organismo, na homeostase dos tecidos e produção de prostaglandina, possui efeitos adversos indesejáveis incluindo sangramentos gastrointestinais, riscos de lesão renal aguda, crônica e hipertensão em humanos [6].

Objetivo

Analisar a toxicidade crônica do fármaco diclofenaco através da determinação da taxa de desenvolvimento embriolarval de ouriço do mar *Echinometra lucunter,* expostos a diversas concentrações.

Material e Métodos

As diluições foram preparadas pouco antes do início do teste, em balões volumétricos, com o auxílio de pipetas automáticas para colocação da substância diluída em tubos de ensaios em diluições seriadas. Foi se diluído 0,01g do fármaco em 100ml de água reconstituída, expostas a diferentes concentrações do fármaco: 1,56 mg/L; 3,12 mg/L; 6,25 mg/L; 12,5 mg/L; 25 mg/L; 50 mg/L e 100 mg/L, incluindo tubos de controle e DMSO. Para 100 mg/L da concentração foi se utilizado 10 ml do fármaco, e assim sucessivamente até atingir a concentração 1,56 mg/L com 0,156ml do fármaco para 9,84ml de água reconstituída. Os ensaios foram realizados em dezembro de 2019, a partir da norma de padronização ABNT NBR 15350: 2012 toxicidade crônica de curta duração [7], método de ensaio com Ouriço do mar Echinodermata: Echinoidea, determinando a taxa de desenvolvimento embriolarval. Utilizado água marinha natural filtrada em membrana de celulose com porosidade de 0,45

µm, para a diluição dos fármacos e manuseio dos gametas. Medição dos teores de oxigênio dissolvido 5,67 mg/L, temperatura 21,8º C, pH 8,35 e salinidade 35. Os organismos foram estimulados através da aplicação de pulsos elétricos para liberação dos gametas e coleta dos óvulos, coletados com auxílio de uma pipeta automática de ponta fina e acondicionados em um béquer seco envolto com gelo. Para a fecundação preparada uma solução na proporção de 0,5 ml de espermatozoide para 25 mL de água de diluição, em seguida acrescentado um volume de 1 ml da solução de esperma ao recipiente contendo os óvulos e aguardado 10 minutos com leve agitação. Após esse período, três subamostras de 10 µL da solução serão colocadas em uma câmara de Sedgwick-Rafter para contagem e cálculo da porcentagem de fecundação (mínimo de 80% de óvulos fecundados para utilização no ensaio). Para a utilização nos ensaios, os óvulos devem ser redondos, lisos e de tamanho homogêneo. Os organismos utilizados nos ensaios foram coletados na Ilha das Palmas (Guarujá, São Paulo) através de mergulho livre, após a coleta foram acondicionados em caixas isotérmicas e cobertos com toalha úmida, em seguida levados ao Laboratório de Ecotoxicologia Prof. Caetano Belliboni na Universidade Santa Cecília - Unisanta, onde são mantidos em tanques com aeração constante em água do mar em condições controladas até o início do ensaio. Os resultados dos testes de toxicidade utilizando o fármaco diclofenaco, foram analisados a partir do resultado das análises estatísticas para avaliação dos efeitos crônicos, empregando o programa estático GraphPad Prism 5.01 métodos de análise de variância (ANOVA – $p < 0,05$), seguida pelo teste Dunnett para identificar as concentrações significativamente diferentes do controle.

Resultados

A exposição do diclofenaco nas concentrações 1,56 mg/L; 3,12 mg/L; 6,25 mg/L; 12,5 mg/L, ocorreram baixa mortalidade próximas ao controle dentro dos parâmetros ambientais. O Diclofenaco foi tóxico causando desenvolvimento embriolarval anormal em concentrações acima de 25 mg/L, sendo continua a mortalidade conforme o aumento da concentração. Quando os embriões foram expostos a concentração 100 mg/L do fármaco, a mortalidade ocorreu em todos os embriões expostos, nenhum embrião se manteve vivo demonstrando tóxico todas as amostras dessa concentração, conforme demonstrado no gráfico (Figura 1).

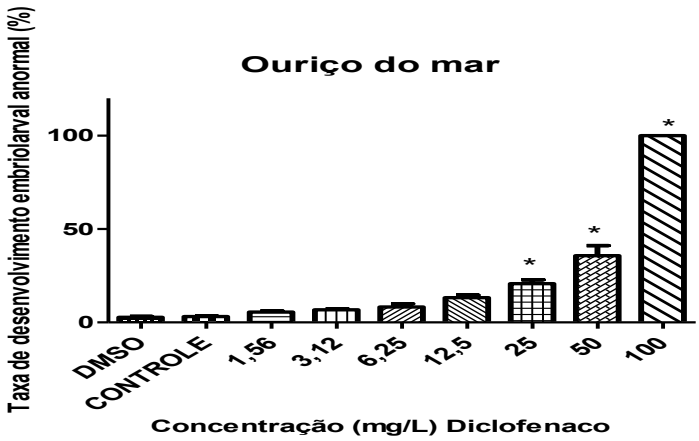

Figura 1: Resultado do ensaio de toxicidade com Ouriço do mar a exposição de diferentes concentrações do fármaco Diclofenaco. Onde * = diferença significativa com o controle (p >0,05).

A exposição dos embriões em concentração do diclofenaco, corroboram com estudos que afirmam que a concentração exposta do diclofenaco ao atingir concentrações maiores, gera efeitos ao estágio da vida da espécie[8]. A absorção do diclofenaco em tecidos de espécies marinhas destaca o achado que depende do tipo de tecido para que haja a bioacumulação [9]. Na verificação do diclofenaco em plasma de espécies marinhas as concentrações encontradas foram maiores se destacando próximas ao nível terapêutico em humanos [10]. [11], verificou se que em espécies maiores o acúmulo no plasma de toxicidade do diclofenaco foi mais alto, onde o risco de ocorrer uma resposta biológica rápida do diclofenaco e de exercer efeitos mortais em diversos peixes através de danos renais e metabolismo de primeira passagem, na entrada de circulação enterohepatica [12].

Conclusão

Os resultados demonstram que os embriões do Ouriço do mar Echinodermata: Echinoidea são sensíveis a exposição de concentrações relevantes do diclofenaco, chegando a serem extremamente tóxicos. Recursos eficazes de tratamento de águas residuais devem ser implantadas, através de estudos que comprovam a toxicidade, demonstrando a necessidade de práticas e regulamentação na legislação ambiental, que garantam a conservação e preservação dos ecossistemas aquáticos.

Agradecimentos: O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Referências

1. Maranho A.L, Camilo D.S.P. **Pharmaceutical and personal care products (ppcps) in the environment: Latin american occurrences, adverse effects and perspectives.** Nova Science Publishers, Inc. 2017.
2. Gutperlet R, Capperucci R.M, Bartholomã A, Kroncke I. **Benthic biodiversity changes in Gesellschaft response to dredging activities during the construction of a deep –water port.** Senckenberg fur Naturforschung and Springer - Verlag Berlin Heidelberg, 2015.
3. Aasawari A.T, Umesh B.k. **Evaluation of trace elements and particulate matter deposition on plant foliage exposed to vehicular pollution.** Department of Botany, The Institute of Science, 15-Madame Cama Road, Fort, Mumbai – 400032, Maharashtra, India. ACTA BOT.CROAT. 78(2):164 -168, 2019.
4. Mezzelani M, Gorbi S, Regoli F. **Pharmaceuticals in the aquatic environments: Evidence of emerged threat and future challenges for marine organisms**. Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente (DiSVA), Università Politecnica delle Marche, Ancona, Italy. Marine environmental research 41-60, 140, 2018.
5. Geissen V, Mol H, Klumpp E, Umlauf G, Nadal M, Ploeg M.V.D, Zee S.E.A.T.M, Ritsema C.J. **Emerging pollutants in the environment: a challenge for water resource management.** International Soil and Water Conservation Research 57 e 65, 2015. http://dx.doi.org/10.1016/j.iswcr.2015.03.002.
6. Intissar A, Wafa M, Rihab B.S, Neji L. **Antifouling processes and toxicity effects of antifouling paints on marine environment.** A review Environmental Toxicology and Pharmacology 57,115 –130, 2018.
7. ABNT – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 15350**: Ecotoxicologia aquática: toxicidade crônica de curta duração – método de ensaio com ouriço do mar (Echinodermata: Echinoidea).** P. 19, 2012.
8. Naslund J, Fick J, Asker N, Ekman E, Larsson D.G.J, Norrgren L. **Diclofenac affects kidney histology in the three-spined stickleback (Gasterosteus aculeatus) at low µg/L concentrations.** Aquat. Toxicol. 189:87–96, 2017. http://dx.doi.org/10.1016/j. aquatox. 2017.05.017.
9. Memmert U, Peither A, Burri R, Weber K, Schmidt T, Sumpter J.P, Hartmann A. **Diclofenac: new data on chronic toxicity and bioconcentration in fish. Environ. Toxicol.** Chem. 32 (2):442– 452, 2013. http://dx.doi.org/10.1002/etc.2085.
10. Cuklev F, Kristiansson E, Fick J, Asker N, Forlin L, Larsson D.G.J. **Diclofenac in fish: blood plasma levels similar to human therapeutic levels affect global hepatic gene expression.** Environ. Toxicol. Chem. 30 (9):2126–2134, 2011. http://dx.doi.org/10. 1002/etc.599.
11. Bickley L.K, Aerle R.V, Brown A.R., Hargreaves A, Huby R, Cammack V, Jackson R, Santos E.M, Tyler C.R. **Bioavailability and kidney responses to diclofenac in the fathead minnow (Pimephales promelas).** Environ. Sci. Technol. 51 (3): 1764–1774, 2017.http://dx.doi.org/10.1021/acs.est.6b05079.
12. Letzel M, Metzner G, Letzel T. **Exposure assessment of the pharmaceutical diclofenac based on long-term measurements of the aquatic input.** Environ. Int. 35 (2):363–368, 2009. http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2008.09.002.