



**Maria Eduarda  
Pinheiro Rocha**

**Efeitos de modificações epigenéticas em  
organismos aquáticos expostos a contaminantes  
ambientais**

**114214**

**Effects of epigenetic modifications in aquatic  
organisms exposed to environmental  
contaminantes**



**Maria Eduarda  
Pinheiro Rocha**

**Efeitos de modificações epigenéticas em organismos  
aquáticos expostos a contaminantes ambientais**

**114214**

**Effects of epigenetic modifications in aquatic organisms  
exposed to environmental contaminants**

Relatório de Projeto de Licenciatura em Biotecnologia, realizado sob a orientação científica de Joana Pereira (Orientadora) e Joana Santos, (Co-orientadora), ambas investigadoras do Centro de Estudos do Ambiente e do Mar e do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

Apoio financeiro

Este trabalho foi realizado no contexto e com financiamento do projeto EPIBOOST, financiado pela União Europeia (UE) através do contrato com a referência 101078991 – as perspetivas e opiniões expressas são as dos autores e não refletem necessariamente as da UE ou da Agência de financiamento (REA); nem a EU nem a REA podem ser responsabilizadas pelas mesmas .



## Palavras Chave

Epigenética, *Daphnia magna*, Ciprofloxacina, Biomarcadores, Metilação do DNA

## Resumo

Resíduos farmacêuticos como antibióticos são cada vez mais reconhecidos como contaminantes de preocupação emergente nos ecossistemas aquáticos. Este estudo avaliou os efeitos subletais da ciprofloxacina (19,57 mg/L; EC20 – concentração que previsivelmente provoca a imobilização de 20% dos organismos em exposições agudas de 48 h) em biomarcadores de stress oxidativo e na metilação do DNA em *Daphnia magna* após 48 horas de exposição. As análises bioquímicas revelaram um aumento estatisticamente significativo na atividade da glutathione S-transferase (GST) nos organismos expostos em comparação com o grupo controle, sugerindo ativação das vias de desintoxicação. Embora a atividade da catalase (CAT) e os níveis de peroxidação lipídica (TBARS) tenham apresentado tendência crescente, essas alterações não foram estatisticamente significativas, indicando uma resposta parcial ao stress oxidativo. Ao nível epigenético, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre o controle e o grupo exposto no que toca à metilação total, no entanto, não é possível afirmar que não existem genes relacionados com o stress oxidativo que tenham sofrido alterações no padrão de metilação. Para isso seria necessário recorrer à sequenciação dos genomas testados, que está a decorrer neste momento em amostras de DNA produzidas no presente trabalho. Estes resultados evidenciam a capacidade da ciprofloxacina para induzir alterações bioquímicas e epigenéticas em *Daphnia magna*, reforçando a importância da integração de parâmetros fisiológicos e moleculares na avaliação ecotoxicológica de contaminantes farmacêuticos.

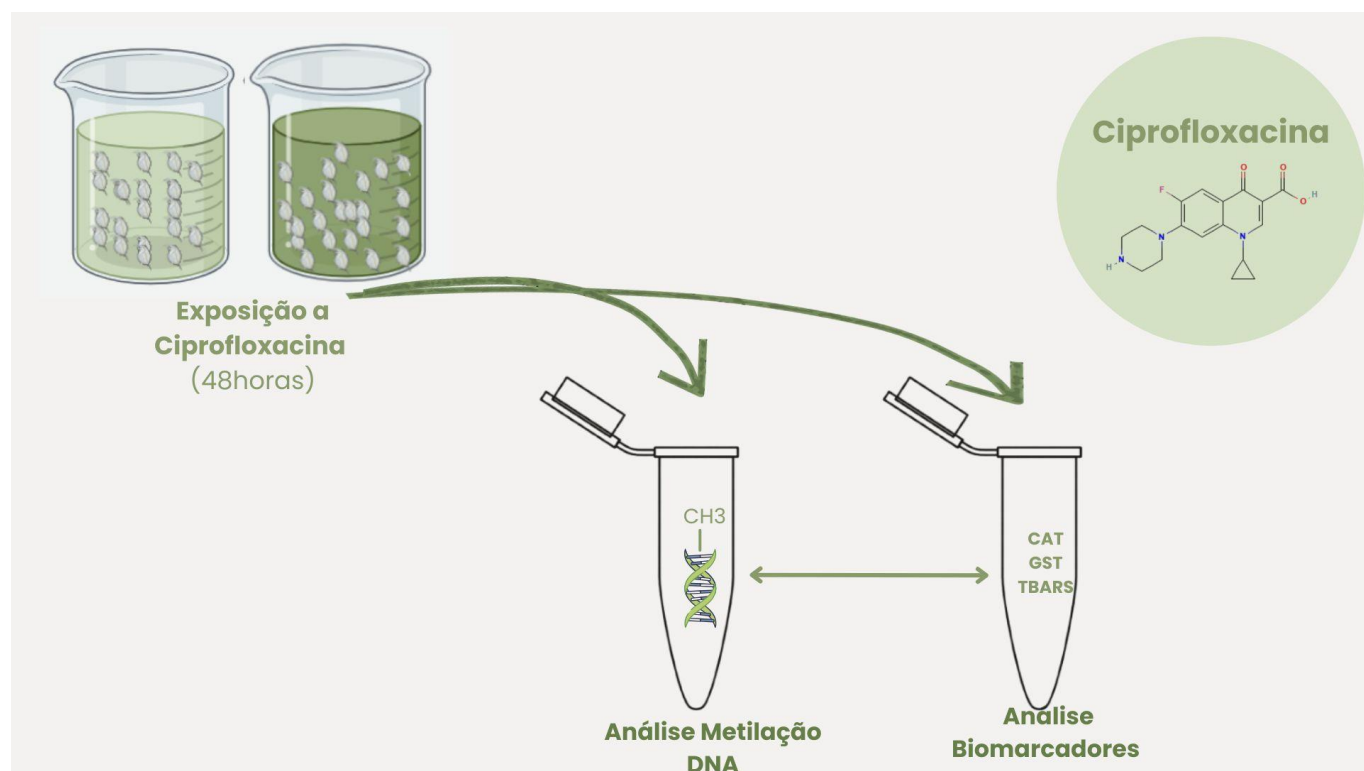
## **Key Words**

Epigenetics, *Daphnia magna*, Ciprofloxacin, Biomarkers, DNA Methylation

## **Abstract**

Pharmaceutical residues such as antibiotics are increasingly recognized as contaminants of emerging concern in aquatic ecosystems. This study evaluated the sublethal effects of ciprofloxacin (19.57 mg/L; EC20 – concentration expected to elicit the immobilization of 20% of the organisms in acute exposures lasting 48 h) on oxidative stress biomarkers and DNA methylation in *Daphnia magna* after 48 hours of exposure. Biochemical analyses revealed a significant increase in glutathione S-transferase (GST) activity in exposed organisms compared to the control group, suggesting activation of detoxification pathways. Although catalase (CAT) activity and lipid peroxidation levels (TBARS) showed an increasing trend, these changes were not significant, indicating a partial oxidative stress response. At the epigenetic level, no significant differences between control and exposed organisms were observed regarding global DNA methylation; however, it is not possible to rule out changes in the methylation patterns of specific genes related to oxidative stress. Investigating this would require whole genome sequencing of the tested organisms, which is currently being done over DNA samples produced in the present work. These results demonstrate ciprofloxacin's ability to induce biochemical and epigenetic alterations in *Daphnia magna*, reinforcing the importance of integrating physiological and molecular parameters in the ecotoxicological assessment of pharmaceutical contaminants.

## Graphical Abstract



## Índice de Figuras

Figura 1: Diagrama representativo do sistema de reprodução assexuada (Partenogénese) e sexuada de *Daphnia* sp. (Ebert, 2005).

Figura 2: Fluxograma de Atividade Enzimática.

Figura 3: Atividade média ( $n = 5$ ) da Catalase (CAT) e Glutathione S-transferase (GST)), bem como concentração de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) em *D. magna* exposta a uma concentração de 0 mg/L (C) e 19,57 mg/L (E) de ciprofloxacina. As barras de erro representam o erro padrão e os asteriscos indicam um efeito significativo (Teste t;  $p < 0.05$ ).

Figura 4: Microplaca durante o ensaio colorimétrico para determinação da metilação global do DNA utilizando o kit MethylFlash™ Global DNA Methylation (5-mC) ELISA Kit (Epigentek).

Figura 5: Níveis médios de metilação global de DNA (5-mC%) em *Daphnia magna* expostas à ciprofloxacina e no grupo controlo; os valores representam a média da percentagem de 5-metilcitosina (5-mC) em relação ao DNA total. As barras e as barras de erro representam a média de 3 réplicas experimentais, com duas réplicas técnicas em geral, e o erro padrão associado, respetivamente.

## Índice

1) Introdução .....	1
1.1) Ciprofloxacina e a sua prevalência no compartimento aquático.....	2
1.2) <i>Daphnia magna</i> como organismo modelo .....	4
1.3) Epigenética.....	5
1.4) Resposta Antioxidante .....	7
1.5) Objetivos .....	9
2) Materiais e Métodos .....	10
2.1) Condições de Cultura.....	10
2.2) Exposição a Ciprofloxacina .....	10
2.3) Extração de DNA.....	11
2.4) Quantificação da metilação global do DNA por ELISA.....	11
2.5) Análise de biomarcadores de stress oxidativo .....	12
2.5.1) Catalase .....	12
2.5.2) Glutathione redutase .....	13
2.5.4) Thiobarbituric Acid Reactive Substances .....	13
2.6) Análise estatística.....	14
3) Resultados.....	14
3.1) Biomarcadores .....	14
3.2) Metilação do DNA.....	15
4) Discussão .....	17
5) Conclusão.....	19
6) Bibliografia .....	20

## 1) Introdução

O crescimento populacional tem levado a um aumento das atividades industriais, agrícolas e urbanas, frequentemente associado a danos nos ecossistemas e à perda de biodiversidade (aus der Beek et al., 2016). As atividades humanas resultam na libertação de contaminantes de origem antropogénica nos recursos hídricos superficiais e subterrâneos. Dentro dos contaminantes antropogénicos, os resíduos farmacêuticos têm sido alvo de estudo nas últimas décadas, sendo considerados como indicadores antrópicos do "ciclo global da água em processo de urbanização" (Castiglioni et al., 2018). Os produtos farmacêuticos são distintos de outros contaminantes que podem coexistir no mesmo ecossistema, uma vez que apresentam atividade biológica, que advém da sua atividade terapêutica (Häder et al., 2020).

A crescente presença de compostos farmacêuticos no ambiente tem gerado preocupação quanto aos seus impactos ecológicos e na saúde humana. Estes contaminantes atingem as massas de água, sedimentos e solo, principalmente através da excreção humana e animal, do descarte inadequado de fármacos não utilizados e dos efluentes de indústrias farmacêuticas. Uma vez libertados, esses compostos podem persistir no ambiente devido à sua resistência à (bio)degradação (Shen et al., 2023).

As Estações de Tratamento de Águas Residuais (ETARs) são contribuintes reconhecidas de fármacos no ambiente, uma vez que recebem águas residuais de uma ampla variedade de setores, como hospitais, domésticos e indústrias farmacêuticas. O tratamento de águas residuais envolve a conversão de águas residuais em água que pode voltar a entrar no ciclo da água. Vários autores como Azuma et al. (2017), Kosma, Lambropoulou and Albanis (2014) e Mendoza et al. (2015) encontraram limitações na remoção de fármacos nos sistemas convencionais, devido às suas propriedades físico-químicas que os tornam recalcitrantes e à variedade de compostos presentes. Esta incapacidade de remoção eficaz, associada a fatores como condições climáticas e processos específicos de tratamento, permite que estes contaminantes cheguem ao ambiente, podendo aí persistir por períodos relevantes, potenciando os seus efeitos ecológicos (Leal, 2020).

Tendo em conta o enquadramento acima, o presente trabalho desenvolve-se no contexto dos efeitos adversos da contaminação por fármacos nos ecossistemas de água doce, que são muito frequentemente recetores de efluentes de ETARs. De facto, a presença de fármacos no compartimento aquático tem sido associada a vários efeitos adversos na biota, como a disrupção de diversos processos fisiológicos e bioquímicos.

Dos fármacos identificados no meio aquático, pertencentes a diferentes classes químicas, os antibióticos têm-se destacado por serem uma presença comum, devido ao facto de serem utilizados quer em humanos, quer em medicina veterinária. Isto é particularmente preocupante porque, sendo propositadamente desenvolvidos para afetar microrganismos, têm a capacidade para afetar a biota ambiental de forma imprevisível (Szarka et al. 2024).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), o consumo global de antibióticos aumentou drasticamente nas últimas décadas. Uma das famílias de antibióticos que tem ganhado importância ambiental devido à sua crescente presença no ambiente aquático é a

das Fluoroquinonas, utilizada no tratamento de diversas infecções bacterianas, incluindo infecções do trato urinário, respiratório, gastrointestinal e pele (Bhatt and Chatterjee 2022).

A esta família pertence a ciprofloxacina, o agente de stress ambiental usado como modelo no presente trabalho.

### 1.1) Ciprofloxacina e a sua prevalência no compartimento aquático

As fluoroquinonas, como a ciprofloxacina, são inibidores diretos da síntese de DNA, uma vez que se ligam ao complexo enzima-DNA, estabilizando as quebras das cadeias de DNA criadas pela DNA girase (topoisomerase II) e pela topoisomerase IV (Hooper 2001). A topoisomerase IV possui a capacidade de separar os cromossomas que, após a replicação, podem encontrar-se entrelaçados, facilitando o relaxamento do superenrolamento do DNA e prevenindo o acumular de tensões que poderiam comprometer o processo de replicação. O antibiótico age inibindo a função dessa enzima, resultando na fragmentação do DNA e posteriormente no bloqueio da replicação celular, impedindo a divisão celular (Bax et al. 2019). A resistência às fluoroquinonas tem sido uma preocupação crescente. Estirpes de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina apresentam uma taxa de resistência superior a 50% às fluoroquinonas (Infarmed, 2009).

A ciprofloxacina é um dos fármacos com maiores concentrações detetadas no meio aquático (Kelly and Brooks 2018). A sua prevalência neste meio é influenciada por uma interação de fatores, como a incidência de luz, a concentração de carbono orgânico e as propriedades químicas da água. A fotodegradação é um dos principais processos responsáveis pela degradação de antibióticos como a ciprofloxacina em ambientes aquáticos. Este processo envolve a decomposição do fármaco através da absorção de luz, resultando na formação de produtos de degradação menos ativos ou até mesmo inativos (Gahrouei et al. 2024).

Foi estudada a taxa de degradação da ciprofloxacina em águas superficiais, tanto em laboratório quanto em sistemas de campo, sob diferentes condições de luz e carbono orgânico particulado (POC), a fim de determinar quando a fotodegradação predomina sobre a adsorção no destino da ciprofloxacina. Esse estudo revelou que o antibiótico sofre fotodegradação rápida quando os níveis de POC eram baixos (Cardoza et al. 2005). No entanto, mesmo níveis moderados de POC na coluna de água resultaram na redução da fotodegradação (nenhum produto de degradação foi detetado), enquanto as taxas de desaparecimento da ciprofloxacina solúvel foram aceleradas, evidenciando adsorção em detrimento da fotodegradação. De uma forma geral a presença de matéria orgânica dissolvida pode atuar como filtro de luz, reduzindo a quantidade de radiação disponível para a fotodegradação. O estudo referido (Cardoza et al. 2005) é um exemplo que apoia a necessidade de estudar os efeitos do antibiótico no meio aquático, especialmente em espécies capazes de ingerir matéria orgânica.

A ciprofloxacina tem sido quantificada em vários ecossistemas aquáticos, sendo que as concentrações variam dependendo da localização, das condições ambientais e da fonte de

contaminação. No lago Michigan, nos EUA, foram encontradas concentrações de 33 ng/g (Maghsodian et al. 2022). Na Europa, concentrações de ciprofloxacina atingiram valores de 339 ng/L no rio Douro em Portugal (Fernandes et al. 2020); no Rio Gościcina, na Polónia, registou-se um valor excepcionalmente alto de 2,7 µg/L (2700 ng/L) (Wagil et al. 2014) e, no rio Glatt, na Suíça, a concentração variou de 0,005 mg/L a 0,018 mg/L (Golet, Alder, and Giger 2002).

Diferentes estudos anteriores demonstram que a ciprofloxacina pode afetar a biota aquática a diversos níveis de organização biológica (tabela 1).

*Tabela 1: Efeitos Toxicológicos a Diferentes Concentrações de ciprofloxacina em Diversos Organismos utilizados como indicadores biológicos*

Organismo	Parâmetro Estudado	Efeito	Concentração	Referência do Estudo
<i>D. magna</i>	Imobilização	Imobilização total	100000 µg/L	(Yisa et al., 2023)
<i>Danio rerio</i>	Desenvolvimento embrionário	Malformações	0,005 µg/L	(Nogueira et al., 2019)
<i>Eisenia fetida</i>	Expressão Genética	Danos no DNA	1 g/kg	(Yang et al., 2020)
<i>P. subcapitata</i>	Crescimento	Inibição do crescimento	2,97 mg/L	(Halling-Sørensen et al., 2000)
<i>D. magna</i>	Comprimento Corporal	Redução do Comprimento	2,5 µg/L	(Dionísio et al., 2020)
<i>Lemna minor</i>	Atividade Enzimática	Stress Oxidativo	0,005 mg/L	(Nunes et al., 2019)
<i>Rhamdia quelen</i>	Histopatologia	Alterações Hematológicas	100 µg/L	(Kitamura et al., 2022)
<i>Vibrio fischeri</i>	Luminescência	Inibição da Luminescência	5,9 mg/L	(Hernando et al., 2007)

Foram observados impactos bioquímicos, histológicos e comportamentais após exposição a ciprofloxacina em vários organismos. Por exemplo, ao longo do desenvolvimento embrionário, *Danio rerio* apresentou malformações na presença de quantidades baixas do antibiótico (0,005 µg/L). Danos no DNA foram observados em espécies como *Eisenia fetida* exposta a 1 mg/kg de ciprofloxacina, enquanto no peixe *Rhamdia quelen* foram detetadas alterações morfológicas e histopatológicas em tecidos vitais, como brânquias, rins e fígado, mesmo quando expostos a concentrações baixas (100 µg/L). No organismo modelo usado no presente estudo, *Daphnia magna*, a ciprofloxacina pode levar a efeitos como a imobilização e alterações no comprimento corporal em concentrações bastante distintas como 100000 µg/L e 2,5 µg/L.

De uma forma geral, o antibiótico representa um potencial perigo para a biota e, conseqüentemente, para a estabilidade dos ecossistemas.

## 1.2) *Daphnia magna* como organismo modelo

O organismo utilizado neste estudo foi *Daphnia magna*. O gênero *Daphnia* compreende mais de 100 espécies conhecidas de organismos planctônicos. Estes organismos são, na sua maioria, dulçaquícolas e alimentam-se principalmente por filtração microalgas e outro material orgânico em suspensão (Ebert 2005).

*Daphnia magna* é um animal cuja estratégia reprodutiva pode alternar entre assexuada e sexuada, como ilustra a figura 1 (Ebert 2005), dependendo de fatores ambientais. Em condições ótimas, a reprodução é assexuada, por partenogênese, e ciclicamente são depositados ovos numa câmara marsupial situada do dorso das fêmeas, que não necessitam de fertilização. Ao longo do tempo a população torna-se composta por fêmeas, todas geneticamente idênticas. Contudo, em condições desvantajosas, como mudanças na temperatura ou indisponibilidade de alimento, estes organismos são estimulados pelo ambiente a produzir machos, que num processo de reprodução sexuada, fecundam as fêmeas. São então formados ovos de resistência, que conseguem suportar circunstâncias desfavoráveis num estado latente e só eclodem quando existem condições ideais que permitam a conservação da população (Harris, Bartlett, and Lloyd 2012).

Este processo de reprodução confere a *Daphnia* sp. vantagens adaptativas e permite-lhe uma maior flexibilidade na rapidez com que ultrapassa as pressões ambientais.

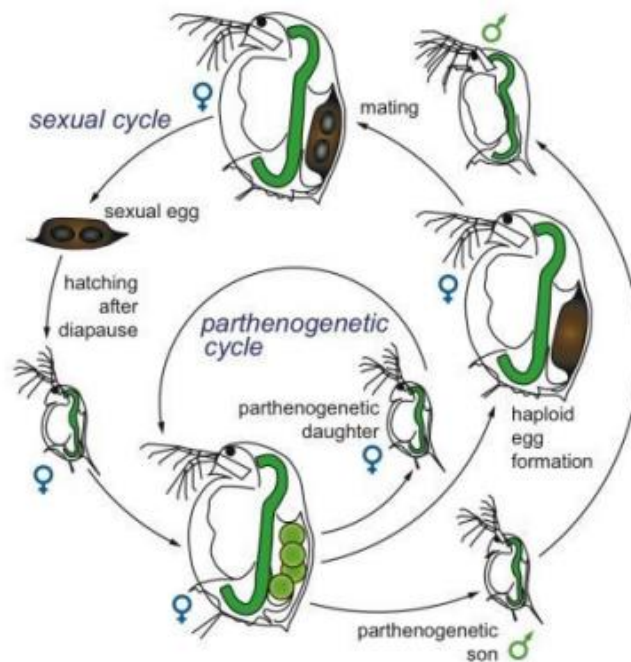


Figura 1: Diagrama representativo do sistema de reprodução assexuada (Partenogênese) e sexuada de *Daphnia* sp. (Ebert, 2005).

Sendo um elemento central na cadeia alimentar, a resposta de *Daphnia magna* aos contaminantes é crucial para o equilíbrio do ecossistema. Além de ser uma fonte de alimento para diversos consumidores secundários aquáticos, uma vez que se alimenta de produtores primários, desempenha também um papel importante no controle da circulação de nutrientes em ambientes de água doce, contribuindo para a qualidade da água e para a manutenção da biodiversidade. A monitorização da sobrevivência, reprodução e respostas fisiológicas de *Daphnia* sp. permite tirar conclusões sobre as implicações ecológicas da contaminação (Cabej, 2021).

As normas internacionais estabelecidas pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD), a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) e a Organização Internacional para Padronização (ISO) reconhecem *Daphnia magna* como um organismo modelo essencial para a avaliação da toxicidade de substâncias químicas no ambiente aquático. Essas diretrizes padronizam metodologias para ensaios ecotoxicológicos, garantindo a comparabilidade dos resultados e sua aplicação na regulamentação ambiental (e.g., OECD, 2004).

### 1.3) Epigenética

O termo “epigenética” foi introduzido em 1942 pelo embriologista Conrad Waddington, que o definiu como o estudo dos processos complexos que medeiam a relação entre o genótipo e o fenótipo durante o desenvolvimento. Estudos posteriores expandiram o conceito de epigenética para além da fase de desenvolvimento dos organismos, demonstrando que fatores como condições ambientais e exposição a tóxicos poderiam introduzir modificações no DNA que não implicam mudanças na sequência genética. Essas alterações, agora associadas ao epigenoma, revelam como influências externas podem ter consequências no fenótipo dos organismos (Somerville et al. 2019).

O epigenoma já demonstrou ser altamente plástico quando exposto a estímulos ambientais externos como a dieta, o exercício, o stress e exposição a tóxicos, levando a alterações químicas ou estruturais do DNA que condicionam a expressão genética e em última instância podem resultar em alterações como a longevidade e o comportamento (Grunau et al. 2019). Ou seja, os mecanismos epigenéticos são uma ligação fundamental entre os fatores ambientais e mudanças fenotípicas.

A definição de epigenética incorpora alterações herdáveis, reversíveis ou não, que afetam a expressão genética sem alterar a sequência genética (Tammen, Friso and Choi 2012). Essas alterações envolvem vários mecanismos. No entanto, existem três principais, sendo eles a metilação de DNA, modificações em histonas e a atividade do RNA não codificante. Destes, o mais conhecido e mais estudado é a metilação de DNA, sendo este o mecanismo epigenético abordado neste trabalho. Em eucariotas, a metilação do DNA dá-se, em geral, através da transferência de um grupo metil da S-adenosil-L-metionina para a posição 5 de uma citosina, formando assim a 5-metilcitosina, num processo mediado por um conjunto de enzimas da família das DNA metiltransferases (Moore, Le and Fan 2012).

Há evidência na literatura de que a exposição de *Daphnia magna* a diferentes agentes de stress induz alterações na metilação do DNA na resposta a estímulos ambientais, nomeadamente em genes associados ao stress oxidativo, permitindo que os organismos adaptem a sua expressão genética em resposta a condições ambientais adversas, variações nutricionais ou mudanças nas condições abióticas (Jeremias et al. 2018; Hearn et al. 2019; Lindeman et al. 2019; Vandegehuchte, Lemaire and Janssen 2009; Jeremias et al. 2024; Pinto et al. 2024).

Os estudos sintetizados na Tabela 2 comprovam que a exposição a diferentes agentes de stress provoca alterações significativas na metilação do DNA em *Daphnia magna*, destacando a hipometilação.

*Tabela 2: Alterações na metilação do DNA provocadas por diversos agentes de stress em Daphnia magna.*

<b>Agente de stress</b>	<b>Concentração</b>	<b>Alterações na Metilação do DNA</b>	<b>Referência do Estudo</b>
<i>Salinidade</i>	4,1 g/L	Hipometilação do DNA	(Jeremias et al., 2018)
<i>Restrição Calórica</i>	-	Hipometilação a baixo nível	(Hearn et al., 2019)
<i>5-Azaxitidina</i>	10 mg/L	Redução da metilação global do DNA nas gerações F0 e F1; alterações na expressão genética e modificações de histonas na F1.	(Lindeman et al., 2019)
<i>Zinco</i>	388± 40 µg/L	F0- sem alteração na metilação; F1- Hipometilação F2-Efeito não persistiu	(Vandegehuchte et al., 2009)
<i>Cobre</i>	10 µg/L	Hipometilação Total	(Jeremias et al., 2024)
<i>Saxitoxina</i>	30 µg/L	Hipometilação	(Pinto et al.,2024)

A exposição a NaCl, por exemplo, resultou em hipometilação de genes relacionados com síntese proteica e reparação do DNA. Embora apenas a geração F0 tenha sido exposta diretamente, as alterações epigenéticas foram herdadas por três gerações subsequentes, indicando a ocorrência de herança transgeracional de marcas epigenéticas. (Jeremias et al. 2018).No caso da restrição calórica, foram identificadas 333 regiões com alterações na metilação, das quais 65% apresentaram hipometilação e 35% hipermetilação. Estas modificações ocorreram em genes específicos ligados à metilação e ao metabolismo lipídico, como os envolvidos na atividade da acil-CoA desidrogenase, sugerindo a existência de um mecanismo adaptativo para fazer face à escassez de nutrientes. (Hearn et al. 2019).A exposição à 5-azacitidina, um inibidor da metilação do DNA, também levou à hipometilação

e resultou em alterações na expressão de genes associados à reprodução, reduzindo o número de descendentes da geração F0. Embora apenas essa geração tenha sido exposta, foram observadas modificações nas histonas na geração subsequente, o que não se verificou na geração anterior, sugerindo que os efeitos epigenéticos da exposição podem ser transmitidos de forma intergeracional (Lindeman et al. 2019).

Por outro lado, o estudo de Vandeghechuchte, Lemièrre, and Janssen (2009) que expôs *Daphnia sp.* a zinco ao longo de três gerações, observou efeitos negativos na reprodução da geração F0 sem alterações detectáveis na metilação. Já na geração F1 foi observada uma diminuição da metilação global do DNA, efeito que não se manteve na geração F2. Mais recentemente, Jeremias et al. (2024) avaliaram os efeitos multi- e transgeracionais da exposição ao cobre, constatando alterações específicas na metilação de genes associados ao stress oxidativo e à detoxificação. Esses resultados reforçam o potencial dessas modificações epigenéticas como biomarcadores para avaliação de risco ambiental.

#### 1.4) Resposta Antioxidante

Os estudos citados na secção anterior evidenciam a importância da avaliação dos efeitos epigenéticos na análise de risco ambiental, uma vez que as modificações podem ter importantes consequências na definição de respostas fenotípicas a diversos agentes de stress ambiental, e consequentemente refletir-se em alterações ecológicas. Assim, os mecanismos de alteração epigenética como a metilação do DNA podem levar a modificações fenotípicas, afetando processos como desenvolvimento, reprodução e comportamento, emergindo como mecanismos dinâmicos e sensíveis que conectam estímulos ambientais a adaptações fenotípicas.

De facto, a indução de stress oxidativo é um cenário comum em espécies expostas a diferentes estímulos de contaminação ambiental. A resposta antioxidante constitui uma linha de defesa celular contra os danos causados pelas espécies reativas de oxigénio (ROS) (Yu et al. 2009). Essas moléculas, extremamente reativas, são produzidas naturalmente durante o metabolismo celular aeróbio. No entanto, a sua produção pode ser exacerbada devido a fatores de stress, como a exposição a ciprofloxacina. O stress oxidativo é resultado de um desequilíbrio entre a produção de ROS e a capacidade do organismo em neutralizá-las. Enzimas como a Glutathione Redutase (Gred), a catalase (CAT) e a glutathione-S-Transferase (GST) atuam em conjunto para neutralizar as ROS e prevenir danos oxidativos nos lípidos, proteínas e DNA. A falha das defesas pode levar a danos oxidativos significativos, incluindo inativação enzimática, degradação proteica, dano no DNA e peroxidação lipídica (Halliwell 1978).

No presente trabalho foram analisadas as enzimas CAT, GST e Gred, sendo que todas integram o sistema antioxidante celular e são essenciais no combate ao stress oxidativo.

A catalase (CAT) desempenha uma dupla função no sistema antioxidante celular, sendo responsável tanto pela decomposição do peróxido de hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), um tipo de espécie

reativa de oxigénio (ROS), quanto pela oxidação de dadores de hidrogénio, utilizando o próprio peróxido como aceitador de eletrões (Baker et al. 2023). Complementarmente, a glutathione S-transferase (GST) é uma enzima multicomponente envolvida na desintoxicação de substâncias tóxicas, desempenhando um papel crucial na proteção dos tecidos contra o stress oxidativo. Esta enzima catalisa a conjugação da glutathione reduzida (GSH) com compostos xenobióticos (substâncias estranhas ao organismo) contendo centros eletrofilicos, facilitando a sua neutralização e excreção através de um ataque nucleofílico do átomo de enxofre presente na GSH (Blanchette, Feng, and Singh 2007). A GSH, por sua vez, é um dos principais antioxidantes não enzimáticos presentes na primeira linha de defesa contra as ROS (Maidana et al. 2006).

Para que o ciclo antioxidante se mantenha funcional e eficiente, é fundamental a atuação da glutathione reductase (GRed), que regenera a GSH a partir da sua forma oxidada (GSSG), utilizando NADPH como dador de eletrões. Este processo é vital para assegurar um fornecimento contínuo de GSH. Tal como outras moléculas contendo cisteína, a glutathione é facilmente oxidada, formando pontes dissulfeto entre duas moléculas e originando o dímero oxidado (GSSG). Essa oxidação ocorre durante a neutralização das ROS, tornando a GSH altamente reativa a grupos tiol. Sendo o tiol mais abundante na célula, a formação de dímeros de glutathione é favorecida (Couto, Wood, and Barber 2016). Assim, a regeneração constante da GSH é essencial para manter a homeostase celular e combater os danos provocados pelo stress oxidativo.

Para além das análises enzimáticas, recorre-se também, para avaliar o grau de dano oxidativo causado às membranas celulares, ao ensaio das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA), conhecido como TBARS (*Thiobarbituric Acid Reactive Substances*). Este método é utilizado na quantificação da peroxidação lipídica, que resulta da ação de ROS sobre os ácidos gordos insaturados presentes nos fosfolípidos das membranas celulares, quando a defesa antioxidante se torna deficitária. Durante esta reação, os radicais livres, como o radical hidroxilo e o peróxido de hidrogénio, interagem com os lípidos da membrana, promovendo a sua degradação e originando subprodutos tóxicos, sendo um deles o malondialdeído (MDA) (Esterbauer, Schaur, and Zollner 1991). O ensaio TBARS permite detetar MDA através da sua reação com o TBA, formando um complexo de cor rosada que é quantificado por espectrofotometria, sendo a sua intensidade diretamente proporcional aos danos na membrana. Assim, este ensaio constitui uma ferramenta para monitorizar a eficácia dos sistemas antioxidantes (Aguilar Diaz De Leon and Borges 2020).

Pinto et al. (2024) mostrou que a hipometilação no DNA após exposição a saxitoxina ocorre quando também ocorre alteração da atividade das enzimas acima mencionadas. O trabalho sugere que a hipometilação observada terá condicionado a um desequilíbrio no sistema antioxidante, evidenciado pela redução da atividade da CAT e aumento compensatório da atividade da GST, indicando um cenário de stresse oxidativo. Assim, os resultados sugerem uma resposta potencialmente coordenada epigeneticamente ao stress oxidativo.

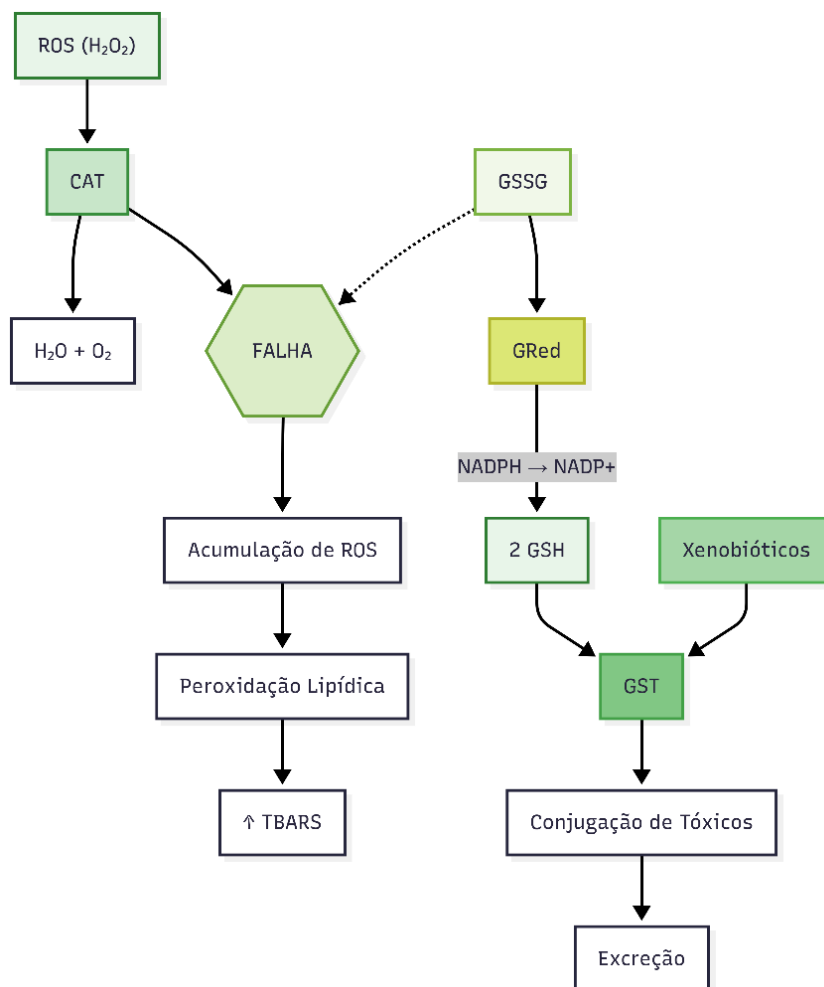


Figura 2: Fluxograma de Atividade Enzimática

### 1.5) Objetivos

O presente projeto teve como objetivo geral a avaliação da resposta epigenética e antioxidante de *D. magna* a uma exposição curta a ciprofloxacina. Mais ainda, pretendeu explorar a potencial ligação entre o efeito da exposição na metilação global do DNA de *D. magna* e as consequências sob o ponto de vista da resposta antioxidante e do dano oxidativo de membranas. Alterações epigenéticas, como a hipometilação de sequências relacionadas com genes antioxidantes, podem estar associadas a um aumento da expressão dessas enzimas, proporcionando, potencialmente, uma defesa mais robusta contra o stress oxidativo. Por outro lado, a metilação excessiva de sequências associadas a genes críticos para a detoxificação poderá comprometer a capacidade dos organismos para sobreviverem, manterem-se e reproduzirem-se, especialmente em cenários de contaminação.

## 2) Materiais e Métodos

### 2.1) Condições de Cultura

Culturas monoclonais de *Daphnia magna* foram mantidas em meio ASTM (aproximadamente 30 indivíduos em 800 mL de meio), que foi preparado utilizando água desionizada como base, com adição de sulfato de cálcio ( $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ), sulfato de magnésio ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) e cloreto de potássio (KCl), além de uma solução combinada de vitaminas contendo tiamina, biotina e cianocobalamina. O meio foi preparado com antecedência para estabilização antes da inoculação das dáfnias. Para além do meio ASTM, os frascos para a manutenção das culturas continham extrato de algas castanhas, atuando como suplemento nutricional, contribuindo para a sobrevivência e o crescimento das dáfnias. Os organismos foram alimentados com suspensões de algas *Raphidocelis subcapitata* numa razão de  $3 \times 10^5$  células/mL. Os frascos de cultura foram mantidos numa câmara com temperatura controlada a de  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ , e fotoperíodo de  $16^{\text{L}}: 8^{\text{D}}$ , sendo o meio de cultura renovado três vezes por semana, altura em que as culturas eram também alimentadas. A renovação das culturas foi realizada com uma das ninhadas n3, n4 ou n5 - a escolha de uma destas ninhadas advém do facto de ser nestas ninhadas que os organismos são mais robustos, estando sob uma menor influência das condições de crescimento maternal.

### 2.2) Exposição a Ciprofloxacina

A concentração usada do antibiótico correspondeu ao EC20 (concentração que provoca a imobilização de 20% da população, no caso após 48 h de exposição) estimada com base nos resultados de um teste de imobilização prévio (OECD, 2004). As soluções do grupo exposto foram preparadas com uma concentração de 19,57 mg/L de ciprofloxacina ( $\text{EC}_{20}$ ) dissolvida em meio ASTM. A ciprofloxacina revela uma dissolução particularmente difícil; de forma a mitigar esse problema, colocou-se a solução numa máquina de ultrassons 3 vezes durante 10 segundos e, seguidamente, o balão volumétrico revestido em papel de alumínio foi colocado no agitador magnético durante 1,5 h.

Antes da exposição, neonatos com menos de 24 horas pertencentes à ninhada n3, n4 ou n5 foram mantidos nas mesmas condições da cultura durante quatro dias, com renovação de meio após dois dias, para que atingissem uma massa corporal que permitisse os testes subsequentes. A exposição teve a duração de 48 horas em 5 réplicas de grupo controlo e 5 réplicas de exposição; o nº de organismos em cada réplica foi ajustado conforme a necessidade de biomassa das análises posteriores, tendo o volume das soluções de teste sido também ajustado assegurando um rácio mínimo de 2 mL por indivíduo, seguindo recomendações padronizadas (OECD 2004).

### 2.3) Extração de DNA

A extração de DNA genómico foi realizada utilizando o kit MasterPure™ Complete DNA and RNA Purification Kit. Utilizou-se 25–50 mg de tecido fresco em microtubos estéreis de 1,5 mL e homogeneizados em 300 µL do tampão de lise fornecido no kit, contendo Proteinase K (50 µg/mL). As amostras foram incubadas a 65°C por 15 minutos com agitação suave para promover a lise celular e a libertação dos ácidos nucleicos. Após a incubação, foi adicionado 150 µL do reagente MPC Protein Precipitation Reagent para precipitar proteínas e outros contaminantes celulares. A mistura foi ao vortex vigorosamente por 10 segundos e centrifugada a 10000 ×g por 10 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante contendo o DNA foi transferido para um novo microtubo contendo 500 µL de isopropanol frio para precipitar o DNA.

As amostras foram centrifugadas a 10000 g por 10 minutos, o sobrenadante descartado e o *pellet* de DNA lavado duas vezes com 70% etanol (1 mL cada). Após secagem, o DNA foi ressuspenso em 35–50 µL de tampão TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) e incubado a 65°C por 5 minutos para garantir a total solubilização. Por fim, a concentração e a pureza do DNA foram determinadas por espectrofotometria, e as amostras foram armazenadas a -80°C.

### 2.4) Quantificação da metilação global do DNA por ELISA

A metilação global do DNA foi quantificada utilizando o kit MethylFlash™ Global DNA Methylation (5 mC) ELISA Easy Kit (Epigentek, Base Catalog P-1030). O DNA genómico foi previamente extraído e quantificado, assegurando uma relação  $A_{260}/A_{280} \geq 1,8$ . Foram diluídos 100 ng de DNA por amostra em tampão TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5) para garantir a estabilidade e evitar degradação. Os padrões foram preparados a partir da solução de controlo positivo fornecida no kit, diluindo-se em série com o controlo negativo para obter concentrações correspondentes a 0 %, 0,1 %, 0,2 %, 0,5 %, 1 %, 2 % e 5 % de 5-mC. Em cada poço da microplaca foram adicionados 100 µL de amostra ou padrão, seguidos por 100 µL de tampão de ligação (Binding Solution), que facilita a imobilização do DNA. Depois, foram adicionados 50 µL do complexo de deteção anti-5-mC, que consiste num anticorpo específico contra 5-metilcitosina conjugado à enzima HRP (Horseradish Peroxidase). A placa foi incubada durante 60 min à temperatura ambiente com agitação suave para permitir a ligação do anticorpo. Após a incubação, realizou-se a lavagem da placa 3 vezes com 200 µL de tampão de lavagem (Wash Buffer) para remover o material não ligado. Em seguida, foram adicionados 100 µL da solução reveladora (Developer Solution), que contém o substrato TMB (3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina) e peróxido de hidrogénio. A enzima HRP catalisa a oxidação do TMB, originando uma coloração azul proporcional ao nível de metilação do DNA presente. Após 10 min a 37 °C, a reação foi interrompida com 100 µL da solução Stop Solution (ácido sulfúrico diluído), que além de parar a reação altera a cor azul para amarelo. Por fim, a absorvância foi lida a 450 nm num leitor de microplacas. A absorvância média dos duplicados foi corrigida subtraindo o valor do controlo negativo e

a percentagem de metilação global (%5-mC) foi determinada a partir da curva padrão gerada pelos standards (0–5 % 5-mC).

## 2.5) Análise de biomarcadores de stress oxidativo

Para a análise de biomarcadores de stress oxidativo, as amostras de *Daphnia magna* foram homogeneizadas em tampão fosfato 50 mM (pH 7,0) contendo 0,1% de Triton X-100, com 40 indivíduos por 2,2 mL de tampão. O processo foi realizado em gelo para preservar a estabilidade enzimática. Após homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 15000 ×g, durante 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi recolhido, separado em alíquotas e processado imediatamente ou armazenado a -80°C até análise. Foram realizadas várias análises para diferentes biomarcadores, sendo eles Catalase, Gred, TBARS e GST.

Os resultados destas análises foram relativizados à concentração total de proteína. Utilizou-se o método de Bradford para calcular a quantidade de proteína presente nas amostras.

O método usado baseia-se na ligação do reagente de Bradford às proteínas presentes na amostra, resultando numa mudança de cor de castanho para azul, sendo que a sua intensidade será diretamente proporcional à quantidade de proteína presente na amostra. A concentração é determinada por integração com uma reta de calibração construída a partir de padrões de  $\gamma$ -globulina bovina (1 mg/mL), com concentrações de P0: Branco (água UP), P1: 0,2 mg/mL, P2: 0,5 mg/mL, P3: 1,0 mg/mL. Os padrões foram obtidos a partir de uma solução de proteína previamente preparada pela dissolução de 10 mg de  $\gamma$ -globulina bovina em 10 mL de água ultrapura (UP). O ensaio foi realizado numa placa de 96 poços, onde se reservaram poços vazios para o controlo de possíveis interferências do material e os restantes poços foram preenchidos com as diferentes concentrações dos padrões de proteína e com as amostras (10  $\mu$ L), previamente homogeneizadas, a ser analisadas. Foi, seguidamente, adicionado aos padrões 250  $\mu$ L da solução diluída de Bio-Rad, obtida através da diluição do reagente de Bio-Rad em água UP e preparada imediatamente antes do seu uso devido à sua fotossensibilidade. As placas permaneceram sob agitação constante por 15 minutos e, seguidamente, procedeu-se à leitura no espectrofotómetro na absorvância de 595 nm.

### 2.5.1) Catalase

A atividade enzimática da Catalase foi feita seguindo o protocolo de Aebi (1984) baseada na sua dupla função - decomposição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e oxidação de dadores de hidrogénio, consumindo peróxido. Para quantificar a catalase é realizada uma monitorização colorimétrica da decomposição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 240 nm.

O ensaio foi realizado em placas de 96 poços UV, onde se adicionou 200  $\mu$ L de amostra e 100  $\mu$ L da solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sendo que as amostras de homogeneizado de *Daphnia magna* foram diluídas 10 vezes. A monitorização da reação foi realizada imediatamente a 240 nm por 3 minutos, com intervalos de 10 segundos entre as leituras, utilizando um leitor de microplacas. A atividade da enzima é obtida pela lei de Beer-Lambert com uma absorvidade molar de  $\epsilon=0,00394 \text{ L}\cdot\text{mmol}^{-1}\cdot\text{mm}^{-1}$ , sendo expressa em unidades por

miligrama de proteína (U(nmol min)/mg de proteína) utilizando os dados de quantificação de proteína obtidos previamente.

#### 2.5.2) Glutathione reductase

A avaliação da atividade da enzima glutathione reductase (GRed) foi feita seguindo o protocolo de Carlberg and Mannervik (1985). Este método baseia-se na monitorização da oxidação do NADPH a 340 nm, que ocorre durante a redução da glutathione oxidada (GSSG) à sua forma reduzida (GSH). Para tal, é necessário preparar as soluções de GSSG 10 mM, NADPH 1 mM em Tris-HCl 10 mM (pH 7,0), tampão de homogeneização (50 mM, pH 7 com triton) e tampão fosfato, ambos preparados pela dissolução de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  em água UP, sendo que o primeiro tem adição de Triton. As soluções foram preparadas imediatamente antes de usar, sendo que a solução de NADPH foi protegida com papel de alumínio, uma vez que é fotossensível.

Numa placa com 96 poços as soluções foram adicionadas pela seguinte ordem: tampão fosfato (pré-aquecido a 25°C), GSSG, água destilada (pré-aquecida a 25°C) e, por último, amostra. A reação foi iniciada adicionando 30  $\mu\text{L}$  de NADPH e a absorvância foi lida a 340 nm durante 5 minutos em intervalos de 20 segundos. A atividade da enzima é obtida pela lei de Beer-Lambert com uma absorvidade molar de  $\epsilon=6,22 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ . A atividade da Gred é normalmente expressa em relação à concentração total de proteína (U(nmol min)/mg de proteína).

#### 2.5.3) Glutathione S-transferase

A atividade da GST foi determinada de acordo com Habig et al. (1974) considerando que a enzima catalisa a reação da glutathione (GSH) com diversos compostos eletrofílicos. A atividade enzimática é avaliada pela conjugação de glutathione (GSH) com 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), formando um produto que pode ser monitorizado colorimetricamente a 340 nm. Para a determinação da atividade enzimática, prepararam-se duas soluções fotossensíveis: GSH (10 mM) e CDNB (60 mM em etanol). A solução de reação é obtida com 4,95 mL de tampão fosfato, 900  $\mu\text{L}$  de GSH 10 mM e 150  $\mu\text{L}$  de CDNB 60 mM. Posteriormente, numa placa com 96 poços, adicionaram-se 100  $\mu\text{L}$  de amostra por poço e 200  $\mu\text{L}$  da solução de reação. A absorvância foi lida imediatamente a 340 nm durante 5 minutos, com intervalos de 10 segundos. A atividade da enzima foi calculada com base na lei de Beer-Lambert, considerando uma absorvidade molar de  $\epsilon = 9,6 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ , sendo expressa em nmol min por miligrama de proteína, cuja concentração fora obtida pelo método de Bradford.

#### 2.5.4) Thiobarbituric Acid Reactive Substances

A peroxidação lipídica foi avaliada através da quantificação de TBARS, pelo método descrito por Buege and Aust (1978), que estima a concentração de malondialdeído (MDA), um subproduto resultante da interação dos ROS com ácidos gordos presentes nas membranas celulares. A 250  $\mu\text{L}$  de amostra adicionaram-se 500  $\mu\text{L}$  de uma solução de ácido tricloroacético a 10%, previamente preparada; seguidamente realizou-se uma centrifugação,

após a qual se recolheu 700 µL do sobrenadante, ao qual se adicionaram 700 µL de uma solução TBA a 1%, aquecida previamente a 60 °C para assegurar a sua total dissolução. As amostras foram depois incubadas em banho-maria a 100°C durante 10 minutos, permitindo a formação do complexo MDA-TBA, que apresenta cor rosa, onde a intensidade da cor apresentada indica um maior dano oxidativo (mais MDA). A absorvância foi lida imediatamente a 535 nm por 5 minutos, com intervalos de 10 segundos. A concentração de TBARS é obtida pela lei de Beer-Lambert com uma absorvidade molar de  $\epsilon=1,56 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ , sendo expressa em nmol por miligrama de proteína.

## 2.6) Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados utilizando o programa estatístico SPSS. Inicialmente, foi realizada a avaliação descritiva das variáveis quantitativas para cada grupo controlo e exposto dos diferentes biomarcadores, apresentando-se a média, o desvio-padrão e o erro-padrão da média.

Para comparar as atividades enzimáticas entre os grupos exposto e controlo, foi aplicado o teste t de Student para amostras independentes. Anteriormente, a suposição de homogeneidade das variâncias foi verificada pelo teste de Levene, assumindo-se homogeneidade para um  $p \geq 0,05$ . Em todas as análises, adotou-se um teste bilateral, considerando-se um nível de significância de 5%.

## 3) Resultados

### 3.1) Biomarcadores

A exposição de *Daphnia magna* à ciprofloxacina (19,57 mg/L) resultou em alterações nas respostas antioxidante, avaliada por três biomarcadores: GST, CAT e TBARS. Os resultados são apresentados na Figura 2.

A atividade da GST apresentou um aumento significativo no grupo exposto comparativamente com o controlo, assumindo variâncias homogêneas ( $t = -3,866$ ;  $p = 0,005$ ). Este aumento na atividade da GST sugere uma ativação clara da resposta antioxidante em *D. magna* em resposta à presença da ciprofloxacina.

Relativamente à CAT, observa-se graficamente um aumento da atividade no grupo exposto em relação ao controlo, porém a diferença não foi significativa ( $t = -1,838$ ;  $p = 0,109$ ).

Quanto aos níveis de TBARS, os resultados indicaram uma tendência de aumento face ao grupo controlo. Apesar do aumento observado, a diferença entre os grupos não foi significativa ( $t = -1,823$ ;  $p = 0,106$ ).

Para além destes biomarcadores, foi também avaliada a atividade da Glutathione Redutase (GRed), uma enzima envolvida na regeneração da GSH, utilizando o NADPH como dador

de elétrons. A atividade da GRed é normalmente acompanhada por uma diminuição progressiva da absorvância a 340 nm, à medida que o NADPH é consumido durante a reação. No entanto, os resultados obtidos não apresentaram a tendência esperada de decréscimo da absorvância ao longo do tempo, impedindo o cálculo da atividade enzimática.

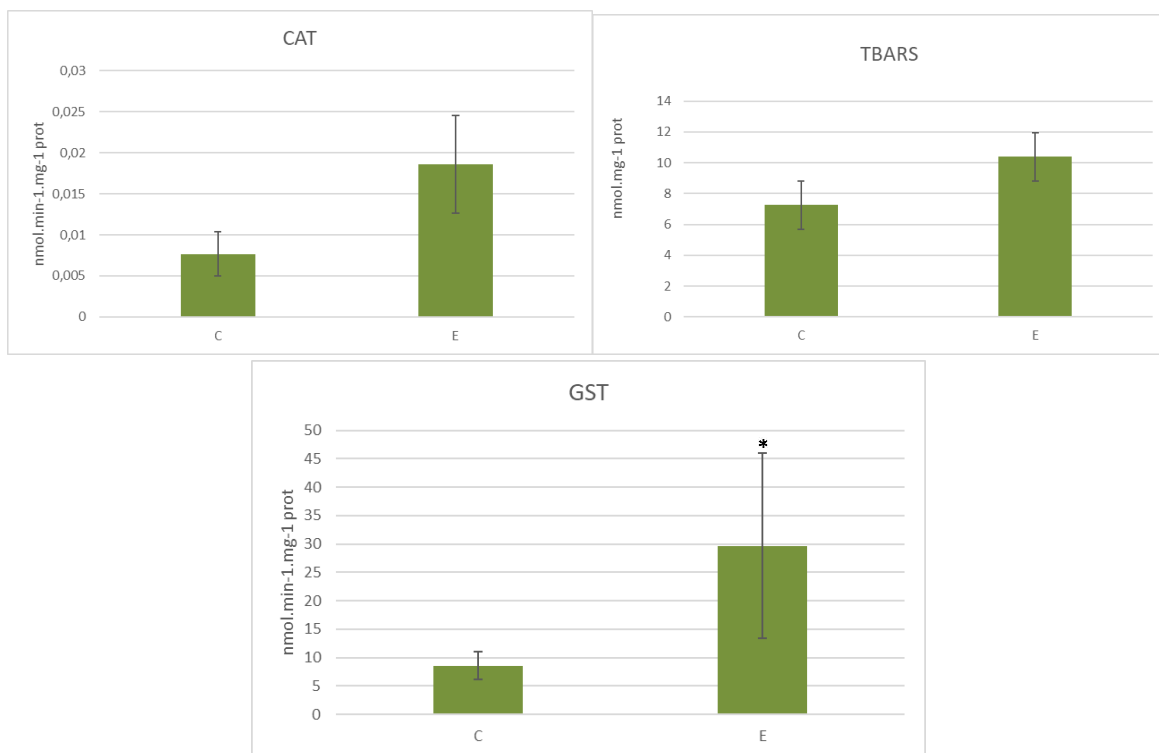


Figura 3: Atividade média ( $n = 5$ ) da Catalase (CAT) e Glutathione S-transferase (GST)), bem como concentração de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) em *D. magna* exposta a uma concentração de 0 mg/L (C) e 19,57 m/L (E) de ciprofloxacina. As barras de erro representam o erro padrão e os asteriscos indicam um efeito significativo (Teste t;  $p < 0.05$ ).

Esses resultados sugerem que a ciprofloxacina ativa a defesa antioxidante, sendo especialmente claro o aumento da atividade da GST, embora este aumento possa também estar relacionado com a sua função de conjugação direta com xenobióticos e não necessariamente com a sua participação direta na eliminação dos ROS.

### 3.2) Metilação do DNA

Após o ensaio colorimétrico para quantificação global da metilação do DNA (Figura 3), observaram-se diferenças claras entre os poços da microplaca. A reação enzimática entre a peroxidase (HRP) e o substrato TMB gerou inicialmente uma coloração azul, proporcional

ao nível de DNA metilado. A adição da solução de paragem converteu o azul em amarelo, formando um produto final estável e monitorizável a 450 nm. A intensidade do amarelo refletiu diretamente o grau de metilação, permitindo comparação quantitativa entre as amostras.

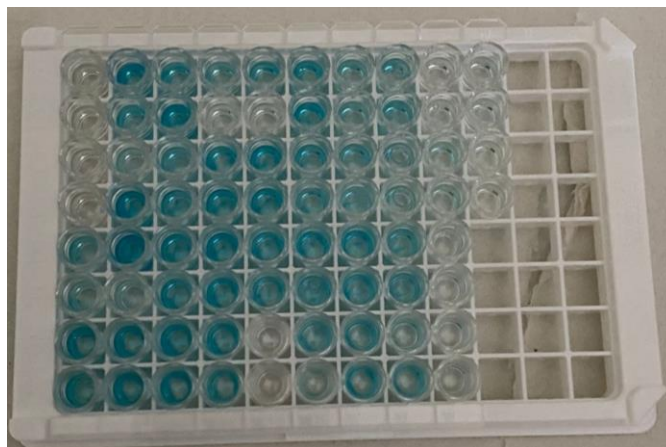


Figura 4: Microplaca durante o ensaio colorimétrico para determinação da metilação global do DNA utilizando o kit MethylFlash™ Global DNA Methylation (5-mC) ELISA Kit (Epigentek).

A análise da metilação global do DNA revelou uma média ligeiramente superior no grupo exposto (Figura 4) em comparação ao grupo controlo. No entanto, não foram verificadas as condições de homogeneidade dos dados, e a diferença observada entre os grupos não foi estatisticamente significativa ( $t=-0,90$ ;  $p=0,930$ ). Assim, a exposição ao tratamento não resultou numa alteração significativa nos níveis totais de metilação do DNA.

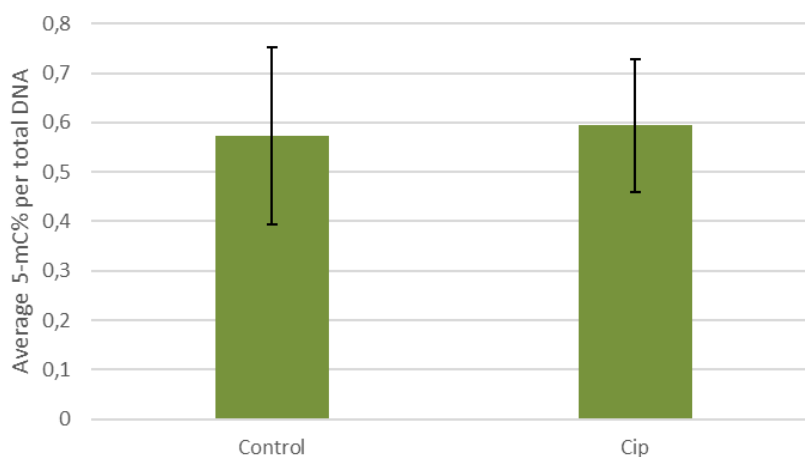


Figura 5: Níveis médios de metilação global de DNA (5-mC%) em *Daphnia magna* expostas à ciprofloxacina e no grupo controlo; os valores representam a média da percentagem de 5-metilcitosina (5-mC) em relação ao DNA total. As barras e as barras de erro representam a média de 3 réplicas experimentais, com duas réplicas técnicas em geral, e o erro padrão associado, respetivamente.

#### 4) Discussão

A exposição à ciprofloxacina induziu alterações significativas nos biomarcadores de stress oxidativo em *Daphnia magna*, nomeadamente o aumento da atividade da GST, acompanhado de uma tendência de aumento nos níveis da CAT e TBARS, usados como indicadores de peroxidação lipídica, ou seja, dano oxidativo de membranas. Estes resultados sugerem uma resposta adaptativa ao contaminante testado, demonstrando a capacidade do organismo em ativar vias de desintoxicação enzimática em condições de stress oxidativo.

A glutathione S-transferase (GST) é uma enzima chave na defesa antioxidante celular, atuando na conjugação de xenobióticos com a glutathione para facilitar a sua excreção. O aumento da atividade da GST pode ser interpretado como uma resposta adaptativa ao aumento de ROS, promovida pela exposição ao antibiótico. Conforme relatado por Oliveira et al. (2015), compostos farmacêuticos podem induzir o sistema de defesa antioxidante em *D. magna*, evidenciado por aumentos significativos na GST e outros biomarcadores. Outros estudos anteriores suportam esta interpretação, como Bartoskova et al. (2014) que revela que exposições a concentrações ambientais de ciprofloxacina (0,7 µg/L) em *Danio rerio* levaram a um aumento significativo da atividade da GST. Wang et al. (2016) demonstrou, em exposições de *Daphnia magna* durante 6 h, o aumento de GST com o aumento da concentração do fármaco ibuprofeno, com uma diferença significativa observada a 50 µg·L<sup>-1</sup> em comparação com o grupo controlo, indicando que o stress de curto prazo com este fármaco pode alterar a atividade da GST. Por outro lado, Oliveira et al. (2015) observaram que, em exposições a determinados fármacos, a resposta da GST pode ser suprimida em concentrações elevadas, sugerindo uma possível saturação ou inibição da via de desintoxicação. A magnitude do aumento da GST observada no estudo realizado por Dionísio et al. (2020), onde exposições a concentrações elevadas de ciprofloxacina (EC50) resultaram em inibição significativa da GST (a partir de 2,563 mg/L até 20,50 mg/L), é associada a falhas no sistema antioxidante e possível desnaturação oxidativa proteica. Importa destacar que os ensaios do presente estudo foram realizados a concentrações equivalentes ao EC20 para imobilização (proxy para mortalidade), o que poderá ter favorecido a ativação de mecanismos adaptativos sem induzir danos oxidativos severos. A GST parece, assim, ter sido induzida antes de se atingir um ponto de colapso enzimático, o que poderia comprometer a sua atividade, tal como sugerido por Dionísio et al. (2020).

A CAT é uma enzima crucial no metabolismo antioxidante, pois atua na decomposição do peróxido de hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), evitando a formação de radicais hidroxil altamente tóxicos (Halliwell, 1978). A tendência de aumento da atividade da CAT observado sugere a ativação das defesas antioxidantes enzimáticas em resposta ao aumento de peróxidos, como o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, gerado em resposta à metabolização da ciprofloxacina. No entanto, a atividade enzimática não apresentou um aumento significativo (p = 0,109).

Bartoskova et al., (2014) observaram que a exposição de *Danio rerio* a norfloxacina, em concentrações de 30 mg/L, resultou num aumento significativo da atividade da catalase, indicando a ativação do sistema antioxidante em resposta ao stress oxidativo induzido por

antibióticos. Já em Dionísio et al. (2020), os resultados são concordantes com os do estudo anteriormente apresentados, sendo que foi observado um aumento significativo da atividade de CAT em *Daphnia magna* após 48 horas de exposição aguda à ciprofloxacina à concentração de 20,50 mg/L. Em contrapartida, Nunes et al. (2018), num estudo com *D. magna* exposta a ciprofloxacina entre 0,1 e 1 mg/L durante 48 h, foi reportada uma ligeira tendência de aumento da atividade da catalase, que, à semelhança dos nossos resultados, não foi significativa. A semelhança da resposta enzimática (aumento da CAT) entre os dois estudos feitos com ciprofloxacina reforça a hipótese de que este fármaco pode induzir stress oxidativo mesmo em exposições de curta duração, ativando defesas antioxidantes. Estes resultados reforçam que, embora os padrões bioquímicos observados apontem para a ativação das defesas antioxidantes, a significância estatística pode ser influenciada por fatores como o nível da concentração, o número de réplicas e a variabilidade intra-grupo, o que não invalida a consistência da resposta fisiológica à exposição à ciprofloxacina. No entanto, deve-se enfatizar que os efeitos pró-oxidativos relatados na literatura foram alcançados em concentrações superiores às usadas no presente estudo.

Relativamente aos TBARS, embora a média tenha sido superior no grupo exposto em comparação com o controlo, essa diferença não foi significativa. Este resultado sugere que, apesar da exposição ter causado algum grau de stress oxidativo, este não foi suficiente para ultrapassar os mecanismos de compensação celular e provocar lesões peroxidativas significativas. Apesar de não se ter verificado um aumento significativo, uma tendência crescente foi observada, sugerindo dificuldades da defesa antioxidante para prevenir o dano oxidativo, que provavelmente não seriam ultrapassadas a concentrações de exposição mais elevadas. O tempo de exposição também pode ser determinante neste aspeto. Por exemplo, no trabalho de Dionísio et al. (2020), *Daphnia magna* foi exposta a ciprofloxacina em concentrações ecologicamente relevantes por diferentes períodos (48 h a 21 dias). A curto prazo (48 h), observou-se um aumento na atividade de enzimas antioxidantes (CAT, GST), mas sem alteração significativa nos níveis de TBARS, implicando ativação eficaz da resposta antioxidante. No entanto, em exposições mais prolongadas, os níveis de TBARS aumentaram de forma significativa, indicando falência progressiva dos mecanismos de defesa antioxidante. De forma semelhante, Oliveira et al. (2015) relataram que a exposição de *D. magna* a paracetamol causou alterações em enzimas antioxidantes como CAT e GST, mas sem efeitos significativos em TBARS, reforçando que a eficácia dos sistemas de defesa antioxidante pode impedir a ocorrência de peroxidação lipídica desde que o stress oxidativo não ultrapasse a capacidade de neutralização de ROS. Assim, efeitos da peroxidação lipídica só se tornam marcantes em exposições prolongadas ou em concentrações mais elevadas, destacando a importância de considerar o tempo de exposição e o nível de stress necessário para gerar dano oxidativo mensurável.

Relativamente à metilação global do DNA em *Daphnia magna* exposta à ciprofloxacina esta apresentou níveis baixos, o que é consistente com o que se observa normalmente neste organismo e em outros invertebrados. Não foram detetadas diferenças estatisticamente

significativas entre o grupo exposto e o controle, embora tenha havido uma ligeira tendência para aumento.

Este padrão é semelhante ao reportado em estudos com outros fármacos, onde a exposição não provoca alterações globais marcadas na metilação, mas pode afetar regiões específicas do genoma. Por exemplo, em Vandeghechuchte et al. (2010) a exposição de *Daphnia magna* a genisteína ou 5-azacitidina, dois compostos com ação epigenética conhecida, não resultou em alterações expressivas da metilação total do DNA, mas causou mudanças em genes ligados ao desenvolvimento e à reprodução.

Um outro exemplo é o trabalho de Falisse et al. (2018), onde *Danio rerio* (zebrafish) foi exposto a triclosan, tendo a metilação global permanecido inalterada, mas verificando-se alterações em genes relevantes. Neste estudo, após exposição ao triclosan durante o desenvolvimento, e apesar de não haver alteração nos níveis globais de metilação do DNA, foram identificados 171 fragmentos diferencialmente metilados. As regiões afetadas incluíam genes relacionados com a via TGF- $\beta$  e a síntese de pirimidinas, com correspondência nos padrões de expressão genética associados ao desenvolvimento nervoso e a fatores de transcrição.

Estes exemplos demonstram que a ausência de variações globais não implica ausência de impacto epigenético ao nível de genes específicos. Assim, no presente estudo com *Daphnia magna* exposta à ciprofloxacina, embora os níveis de 5-mC global não apresentem diferenças significativas, é plausível que alterações ocorram em genes envolvidos em stress oxidativo ou detoxificação. Assim, os resultados obtidos sugerem que a ciprofloxacina pode seguir o mesmo padrão, ou seja, não alterar drasticamente a metilação global, mas potencialmente afetar genes específicos. No entanto, para confirmar esta hipótese, será necessário realizar análises por sequenciação para identificar que regiões ou genes sofreram alterações. Esta fase de análise genómica está neste momento a decorrer, sobre as amostras de DNA geradas no âmbito do presente trabalho.

## 5) Conclusão

A exposição de *Daphnia magna* à ciprofloxacina, na concentração de 19,57 mg/L (EC20), resultou em respostas fisiológicas e bioquímicas indicativas de stress oxidativo e possível modulação epigenética. A análise dos biomarcadores revelou um aumento significativo na atividade da Glutathione S-transferase (GST), sugerindo ativação da via antioxidante como resposta adaptativa ao stress induzido pelo antibiótico. Embora as atividades da catalase (CAT) e os níveis de peroxidação lipídica (TBARS) tenham mostrado tendência de aumento, estas alterações não foram estatisticamente significativas, o que pode indicar uma resposta parcial ou uma variabilidade individual não negligenciável.

No plano epigenético, os resultados mostram que a exposição à ciprofloxacina não induziu alterações significativas na metilação global do DNA em *Daphnia magna*. Estes dados sugerem que a regulação epigenética pode não ocorrer a nível global, mas poderá existir em

regiões específicas do genoma. Para confirmar esta hipótese, serão necessárias análises complementares de sequenciação que permitam identificar genes que possam ter sido alvo de metilação diferencial.

Em suma, os resultados obtidos indicam que a ciprofloxacina pode atuar como um agente disruptor em *Daphnia magna*, ativando mecanismos de defesa antioxidante e possivelmente interferindo na metilação do DNA. Os resultados reforçam a necessidade de uma avaliação mais abrangente dos efeitos subletais de antibióticos no ambiente aquático, não apenas a nível fisiológico, mas também ao nível molecular e epigenético.

## 6) Bibliografia

- Aebi, Hugo. 1984. “[13] Catalase in Vitro.” *Methods in Enzymology* 105 (C): 121–26. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3).
- Aguilar Diaz De Leon, Jesús, and Chad R. Borges. 2020. “Evaluation of Oxidative Stress in Biological Samples Using the Thiobarbituric Acid Reactive Substances Assay.” *Journal of Visualized Experiments (JoVE)* 2020 (159): e61122. <https://doi.org/10.3791/61122>.
- aus der Beek, T., Weber, F. A., Bergmann, A., Hickmann, S., Ebert, I., Hein, A., & Küster, A. (2016). Pharmaceuticals in the environment-Global occurrences and perspectives. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 35(4), 823–835. <https://doi.org/10.1002/etc.3339>
- Azuma, Takashi, Mao Ishida, Kanae Hisamatsu, Ayami Yunoki, Kana Otomo, Mari Kunitou, Mai Shimizu, Kaori Hosomaru, Shiori Mikata, and Yoshiki Mino. 2017. “A Method for Evaluating the Pharmaceutical Deconjugation Potential in River Water Environments.” *Chemosphere* 180 (August):476–82. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2017.04.040>.
- Bartoskova, M., Dobsikova, R., Stancova, V., Pana, O., Zivna, D., Plhalova, L., Blahova, J., & Marsalek, P. (2014). Norfloxacin—Toxicity for Zebrafish (*Danio rerio*) Focused on Oxidative Stress Parameters. *BioMed Research International*, 2014(1), 560235. <https://doi.org/10.1155/2014/560235>
- Baker, Alison, Chi Chuan Lin, Casey Lett, Barbara Karpinska, Megan H. Wright, and Christine H. Foyer. 2023. “Catalase: A Critical Node in the Regulation of Cell Fate.” *Free Radical Biology and Medicine* 199 (April):56–66. <https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2023.02.009>.
- Bax, Benjamin D., Garib Murshudov, Anthony Maxwell, and Thomas Germe. 2019. “DNA Topoisomerase Inhibitors: Trapping a DNA-Cleaving Machine in Motion.” *Journal of Molecular Biology* 431 (18): 3427–49. <https://doi.org/10.1016/J.JMB.2019.07.008>.
- Bhatt, Sunidhi, and Subhankar Chatterjee. 2022. “Fluoroquinolone Antibiotics: Occurrence, Mode of Action, Resistance, Environmental Detection, and Remediation – A Comprehensive Review.” *Environmental Pollution* 315 (December). <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.120440>.
- Blahová, Jana, Lucie Plhalová, Martin Hostovský, Lenka Divišová, Radka Dobšíková, Ivana Mikulíková, Stanislava Štěpánová, and Zdeňka Svobodová. 2013. “Oxidative Stress Responses in Zebrafish *Danio Rerio* after Subchronic Exposure to Atrazine.” *Food and Chemical Toxicology* 61 (November):82–85. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.02.041>.
- Blanchette, Brian, Xia Feng, and Bal Ram Singh. 2007. “Marine Glutathione S-Transferases.” *Marine Biotechnology* 9 (5): 513–42. <https://doi.org/10.1007/S10126-007-9034-0>.
- Buege, John A., and Steven D. Aust. 1978. “Microsomal Lipid Peroxidation.” *Methods in Enzymology* 52 (C): 302–10. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(78\)52032-6](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(78)52032-6).
- Cabej, N. R. (2021). Brain involvement in phenotypic evolution. *The Inductive Brain in Development and Evolution*, 139–200. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85154-1.00006-0>
- Cao, Ruiwen, Dan Wang, Qianyu Wei, Qing Wang, Dinglong Yang, Hui Liu, Zhijun Dong, Xiaoli Zhang, Qianqian Zhang, and Jianmin Zhao. 2018. “Integrative Biomarker Assessment of the Influence of Saxitoxin on Marine Bivalves: A Comparative Study of the Two Bivalve Species Oysters, *Crassostrea Gigas*, and Scallops, *Chlamys Farreri*.” *Frontiers in Physiology* 9 (AUG). <https://doi.org/10.3389/FPHYS.2018.01173>.

- Castiglioni, S., Davoli, E., Riva, F., Palmiotto, M., Camporini, P., Manenti, A., & Zuccato, E. (2018). Mass balance of emerging contaminants in the water cycle of a highly urbanized and industrialized area of Italy. *Water Research*, 131, 287–298. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.12.047>
- Cardoza, L. A., C. W. Knapp, C. K. Larive, J. B. Belden, M. Lydy, and D. W. Graham. 2005. “Factors Affecting the Fate of Ciprofloxacin in Aquatic Field Systems.” *Water, Air, and Soil Pollution* 161 (1–4): 383–98. <https://doi.org/10.1007/S11270-005-5550-6>.
- Carlberg, I., & Mannervik, B. (1985). Glutathione reductase. In *Methods in Enzymology* (Vol. 113, pp. 484–490). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(85\)13062-4](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(85)13062-4)
- Couto, Narciso, Jennifer Wood, and Jill Barber. 2016. “The Role of Glutathione Reductase and Related Enzymes on Cellular Redox Homeostasis Network.” *Free Radical Biology and Medicine* 95 (June):27–42. <https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2016.02.028>.
- Dionísio, Ricardo, David Daniel, Gilberto Dias de Alkimin, and Bruno Nunes. 2020. “Multi-Parametric Analysis of Ciprofloxacin Toxicity at Ecologically Relevant Levels: Short- and Long-Term Effects on *Daphnia Magna*.” *Environmental Toxicology and Pharmacology* 74 (February). <https://doi.org/10.1016/J.ETAP.2019.103295>.
- Ebert, Dieter. 2005. “Introduction to *Daphnia* Biology.” <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2042/>.
- EpigenTek. MethyFlash™ Global DNA Methylation (5-mC) ELISA Easy Kit (Colorimetric). Base Catalog P-1030. EpigenTek Complete Solutions for Epigenetics; 2024. Disponível em: <https://www.epigentek.com>
- Esterbauer, Hermann, Rudolf Jörg Schaur, and Helmward Zollner. 1991. “Chemistry and Biochemistry of 4-Hydroxynonenal, Malonaldehyde and Related Aldehydes.” *Free Radical Biology and Medicine* 11 (1): 81–128. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(91\)90192-6](https://doi.org/10.1016/0891-5849(91)90192-6).
- Falisse, E., Ducos, B., Stockwell, P. A., Morison, I. M., Chatterjee, A., & Silvestre, F. (2018). DNA methylation and gene expression alterations in zebrafish early-life stages exposed to the antibacterial agent triclosan. *Environmental Pollution*, 243, 1867–1877. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2018.10.004>
- Fernandes, Maria João, Paula Paíga, Ana Silva, Carmen Pérez Llaguno, Manuela Carvalho, Felipe Macías Vázquez, and Cristina Delerue-Matos. 2020. “Antibiotics and Antidepressants Occurrence in Surface Waters and Sediments Collected in the North of Portugal.” *Chemosphere* 239 (January). <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2019.124729>.
- Gahrouei, Amirreza Erfani, Sajjad Vakili, Ali Zandifar, and Sina Pourebrahimi. 2024. “From Wastewater to Clean Water: Recent Advances on the Removal of Metronidazole, Ciprofloxacin, and Sulfamethoxazole Antibiotics from Water through Adsorption and Advanced Oxidation Processes (AOPs).” *Environmental Research* 252 (July):119029. <https://doi.org/10.1016/J.ENVRES.2024.119029>.
- Golet, Eva M., Alfredo C. Alder, and Walter Giger. 2002. “Environmental Exposure and Risk Assessment of Fluoroquinolone Antibacterial Agents in Wastewater and River Water of the Glatt Valley Watershed, Switzerland.” *Environmental Science and Technology* 36 (17): 3645–51. <https://doi.org/10.1021/ES0256212>.
- Grunau, Christoph, Jérémy Le Luyer, Martin Laporte, and Dominique Joly. 2019. “The Epigenetics Dilemma.” *Genes* 11 (1): 23. <https://doi.org/10.3390/GENES11010023>.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974. Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249, 7130–7139
- Häder, D. P., Banaszak, A. T., Villafañe, V. E., Narvarte, M. A., González, R. A., & Helbling, E. W. (2020). Anthropogenic pollution of aquatic ecosystems: Emerging problems with global implications. *Science of The Total Environment*, 713, 136586. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2020.136586>
- Halliwell, Barry. 1978. “Biochemical Mechanisms Accounting for the Toxic Action of Oxygen on Living Organisms: The Key Role of Superoxide Dismutase.” *Cell Biology International Reports* 2 (2): 113–28. [https://doi.org/10.1016/0309-1651\(78\)90032-2](https://doi.org/10.1016/0309-1651(78)90032-2).
- Harris, Kami D. M., Nicholas J. Bartlett, and Vett K. Lloyd. 2012. “*Daphnia* as an Emerging Epigenetic Model Organism.” *Genetics Research International* 2012 (1): 147892. <https://doi.org/10.1155/2012/147892>.
- Hearn, Jack, Marianne Pearson, Mark Blaxter, Philip J. Wilson, and Tom J. Little. 2019. “Genome-Wide Methylation Is Modified by Caloric Restriction in *Daphnia Magna*.” *BMC Genomics* 20 (1): 1–11. <https://doi.org/10.1186/S12864-019-5578-4/TABLES/2>.
- Hooper, D. C. 2001. “Mechanisms of Action of Antimicrobials: Focus on Fluoroquinolones.” *Clinical Infectious Diseases* 32 (Supplement\_1): S9–15. <https://doi.org/10.1086/319370>.
- Hernando, M. D., S. De Vettori, M. J. Martínez Bueno, and A. R. Fernández-Alba. 2007. “Toxicity Evaluation with *Vibrio Fischeri* Test of Organic Chemicals Used in Aquaculture.” *Chemosphere* 68(4):724–30. doi:10.1016/J.CHEMOSPHERE.2006.12.097.
- Infarmed. 2009. “Anexos Folcodina.” Infarmed – Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde,I.P [https://www.infarmed.pt/documents/15786/2323424/Anexos\\_Folcodina.pdf/7f8cc7cc-21c2-49ef-94d5-8a5e59e654f6?version=1.0](https://www.infarmed.pt/documents/15786/2323424/Anexos_Folcodina.pdf/7f8cc7cc-21c2-49ef-94d5-8a5e59e654f6?version=1.0)

- Jeremias, Guilherme, João Barbosa, Sérgio M. Marques, Karel A.C. De Schamphelaere, Filip Van Nieuwerburgh, Dieter Deforce, Fernando J.M. Gonçalves, Joana Luísa Pereira, and Jana Asselman. 2018. "Transgenerational Inheritance of DNA Hypomethylation in *Daphnia Magna* in Response to Salinity Stress." *Environmental Science and Technology* 52 (17): 10114–23. [https://doi.org/10.1021/ACS.EST.8B03225/SUPPL\\_FILE/ES8B03225\\_SI\\_001.PDF](https://doi.org/10.1021/ACS.EST.8B03225/SUPPL_FILE/ES8B03225_SI_001.PDF).
- Jeremias, Guilherme, Ana Belén Muñiz-González, Fernando José Mendes Gonçalves, José Luis Martínez-Guitarte, Jana Asselman, and Joana Luísa Pereira. 2024. "History of Exposure to Copper Influences Transgenerational Gene Expression Responses in *Daphnia Magna*." *Epigenetics* 19 (1). <https://doi.org/10.1080/15592294.2023.2296275;WGROU:STRING:PUBLICATION>.
- Kelly, Kaitlyn R., and Bryan W. Brooks. 2018. "Global Aquatic Hazard Assessment of Ciprofloxacin: Exceedances of Antibiotic Resistance Development and Ecotoxicological Thresholds." *Progress in Molecular Biology and Translational Science* 159 (January):59–77. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2018.07.004>.
- Kitamura, Rafael Shinji Akiyama, Maiara Vicentini, Maiara Carolina Perussolo, Juliana Roratto Lirola, Camilla Freitas Cirilo dos Santos, Júlio César Moreira Brito, Marta Margarete Cestari, Maritana Mela Prodocimo, Marcelo Pedrosa Gomes, and Helena Cristina Silva de Assis. 2022. "Sublethal Biochemical, Histopathological and Genotoxicological Effects of Short-Term Exposure to Ciprofloxacin in Catfish *Rhamdia Quelen*." *Environmental Pollution* 300. doi:10.1016/j.envpol.2022.118935.
- Kosma, Christina I., Dimitra A. Lambropoulou, and Triantafyllos A. Albanis. 2014. "Investigation of PPCPs in Wastewater Treatment Plants in Greece: Occurrence, Removal and Environmental Risk Assessment." *Science of The Total Environment* 466–467 (January):421–38. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2013.07.044>.
- Leal, A. P. B. (2020). *Fármacos em águas residuais: Análise, remoção e biorecuperação – Experiência profissionalizante na vertente de farmácia comunitária, hospitalar e investigação* [Dissertação de mestrado, Universidade da Beira Interior]. UBIliorum.
- Lindeman, Leif Christopher, Jens Thaulow, You Song, Jorke H Kamstra, Li Xie, Jana Asselman, Peter Aleströ, and Knut Erik Tollefsen. 2019. "Epigenetic, Transcriptional and Phenotypic Responses in Two Generations of *Daphnia Magna* Exposed to the DNA Methylation Inhibitor 5-Azacytidine." *Environmental Epigenetics*, 1–12. <https://doi.org/10.1093/eep/dvz016>.
- Maghsodian, Zeinab, Ali Mohammad Sanati, Tebogo Mashifana, Mika Sillanpää, Shengyu Feng, Tan Nhat, and Bahman Ramavandi. 2022. "Occurrence and Distribution of Antibiotics in the Water, Sediment, and Biota of Freshwater and Marine Environments: A Review." *Antibiotics* 2022, Vol. 11, Page 1461 11 (11): 1461. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS11111461>.
- Maidana, M., V. Carlis, F. G. Galhardi, J. S. Yunes, L. A. Geracitano, J. M. Monserrat, and D. M. Barros. 2006. "Effects of Microcystins over Short- and Long-Term Memory and Oxidative Stress Generation in Hippocampus of Rats." *Chemico-Biological Interactions* 159 (3): 223–34. <https://doi.org/10.1016/J.CBI.2005.12.001>.
- Melegari, Silvia P., François Perreault, Serge Moukha, Radovan Popovic, Edmond E. Creppy, and William G. Matias. 2012. "Induction to Oxidative Stress by Saxitoxin Investigated through Lipid Peroxidation in Neuro 2A Cells and *Chlamydomonas Reinhardtii* Alga." *Chemosphere* 89 (1): 38–43. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2012.04.009>.
- Mendoza, A., J. Aceña, S. Pérez, M. López de Alda, D. Barceló, A. Gil, and Y. Valcárcel. 2015. "Pharmaceuticals and Iodinated Contrast Media in a Hospital Wastewater: A Case Study to Analyse Their Presence and Characterise Their Environmental Risk and Hazard." *Environmental Research* 140 (July):225–41. <https://doi.org/10.1016/J.ENVRES.2015.04.003>.
- Moore, Lisa D., Thuc Le, and Guoping Fan. 2012. "DNA Methylation and Its Basic Function." *Neuropsychopharmacology* 38 (1): 23. <https://doi.org/10.1038/NPP.2012.112>.
- Nogueira, Ana F., Glória Pinto, Barbara Correia, and Bruno Nunes. 2019. "Embryonic Development, Locomotor Behavior, Biochemical, and Epigenetic Effects of the Pharmaceutical Drugs Paracetamol and Ciprofloxacin in Larvae and Embryos of *Danio Rerio* When Exposed to Environmental Realistic Levels of Both Drugs." *Environmental Toxicology* 34(11):1177–90. doi:10.1002/TOX.22819.
- Nunes, Bruno, Vítor Veiga, Silja Frankenbach, João Seródio, and Glória Pinto. 2019. "Evaluation of Physiological Changes Induced by the Fluoroquinolone Antibiotic Ciprofloxacin in the Freshwater Macrophyte Species *Lemna Minor* and *Lemna Gibba*." *Environmental Toxicology and Pharmacology* 72 (November). <https://doi.org/10.1016/j.etap.2019.103242>.
- Nunes B, Rodrigues AC, Felício JR, Antunes SC, Correia AT. Effects of ciprofloxacin on *Daphnia magna*: oxidative stress, lipid peroxidation and DNA damage. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2018;25(35):35587-35595. doi:10.1007/s11356-018-3496-7.

- Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). (2004). *Test No. 202: Daphnia sp. Acute Immobilisation Test*. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. OECD Publishing. <https://doi.org/10.1787/9789264069947-en>
- Oliveira, Laura L.D., Sara C. Antunes, Fernando Gonçalves, Odete Rocha, and Bruno Nunes. 2015. "Evaluation of Ecotoxicological Effects of Drugs on *Daphnia Magna* Using Different Enzymatic Biomarkers." *Ecotoxicology and Environmental Safety* 119 (September):123–31. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.04.028>.
- Parolini, Marco, and Andrea Binelli. 2012. "Sub-Lethal Effects Induced by a Mixture of Three Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs) on the Freshwater Bivalve *Dreissena Polymorpha*." *Ecotoxicology* 21 (2): 379–92. <https://doi.org/10.1007/S10646-011-0799-6/TABLES/2>.
- Pinto, Albano, Inês P.E. Macário, Sérgio M. Marques, Joana Lourenço, Inês Domingues, Maria João Botelho, Jana Asselman, Patrícia Pereira, and Joana L. Pereira. 2024. "A Short-Term Exposure to Saxitoxin Triggers a Multitude of Deleterious Effects in *Daphnia Magna* at Levels Deemed Safe for Human Health." *Science of The Total Environment* 951 (November):175431. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2024.175431>.
- Shen, M., Hu, Y., Zhao, K., Li, C., Liu, B., Li, M., Lyu, C., Sun, L., & Zhong, S. (2023). Occurrence, Bioaccumulation, Metabolism and Ecotoxicity of Fluoroquinolones in the Aquatic Environment: A Review. *Toxics*, 11(12). <https://doi.org/10.3390/TOXICS11120966>,
- Somerville, Vincent, Michaela Schwaiger, Philipp E. Hirsch, Jean Claude Walser, Karen Bussmann, Alexandra Weyrich, Patricia Burkhardt-Holm, and Irene Adrian-Kalchhauser. 2019. "DNA Methylation Patterns in the Round Goby *Hypophthalmus* Support an On-the-Spot Decision Scenario for Territorial Behavior." *Genes* 10 (3). <https://doi.org/10.3390/GENES10030219>.
- Szarka, Agneša, Lucia Vnuková, Zuzana Keršňáková, Nicolette Viktorová, and Svetlana Hrouzková. 2024. "Contamination with Pharmaceuticals in Aquatic Environment: Focus on Analytical Methodologies." *Applied Sciences* 2024, Vol. 14, Page 8645 14 (19): 8645. <https://doi.org/10.3390/APP14198645>.
- Tammen, Stephanie A., Simonetta Friso, and Sang Woon Choi. 2012. "Epigenetics: The Link between Nature and Nurture." *Molecular Aspects of Medicine* 34 (4): 753. <https://doi.org/10.1016/J.MAM.2012.07.018>.
- Vandegehuchte, M. B., F. Lemièrè, and C. R. Janssen. 2009. "Quantitative DNA-Methylation in *Daphnia Magna* and Effects of Multigeneration Zn Exposure." *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 150 (3): 343–48. <https://doi.org/10.1016/J.CBPC.2009.05.014>.
- Vandegehuchte, M. B., Lemièrè, F., Vanhaecke, L., Vanden Berghe, W., & Janssen, C. R. (2010). Direct and transgenerational impact on *Daphnia magna* of chemicals with a known effect on DNA methylation. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 151(3), 278–285. <https://doi.org/10.1016/J.CBPC.2009.11.007>
- Wagil, Marta, Jolanta Kumirska, Stefan Stolte, Alan Puckowski, Joanna Maszkowska, Piotr Stepnowski, and Anna Białk-Bielińska. 2014. "Development of Sensitive and Reliable LC-MS/MS Methods for the Determination of Three Fluoroquinolones in Water and Fish Tissue Samples and Preliminary Environmental Risk Assessment of Their Presence in Two Rivers in Northern Poland." *Science of The Total Environment* 493 (September):1006–13. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2014.06.082>.
- Wang, Chengrun, Hong Rong, Haitao Liu, Xiaofei Wang, Yixin Gao, Ruhua Deng, Ruiyu Liu, Yun Liu, and Di Zhang. 2018. "Detoxification Mechanisms, Defense Responses, and Toxicity Threshold in the Earthworm *Eisenia Foetida* Exposed to Ciprofloxacin-Polluted Soils." *Science of The Total Environment* 612 (January):442–49. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2017.08.120>.
- Wang, L., Peng, Y., Nie, X., Pan, B., Ku, P., & Bao, S. (2016). Gene response of CYP360A, CYP314, and GST and whole-organism changes in *Daphnia magna* exposed to
- Yang, Xuelian, Yuanbo Li, and Xing Wang. 2020. "Effects of Ciprofloxacin Exposure on the Earthworm *Eisenia Fetida*." *Environmental Pollution* 262. doi:10.1016/J.ENVPOL.2020.114287.
- Yisa, Abraham Gana, Mathias Ahii Chia, Ibrahim Madu Katsallah Gadzama, Sonnie Joshua Oniye, Ramatu Idris Sha'aba, and Balli Gauje. 2023. "Immobilization, Oxidative Stress and Antioxidant Response of *Daphnia Magna* to Amoxicillin and Ciprofloxacin." *Environmental Toxicology and Pharmacology* 98. doi:10.1016/J.ETAP.2023.104078.
- Yu, Miao, San Hu Wang, Yan Rui Luo, Ya Wei Han, Xiao Yu Li, Bang Jun Zhang, and Jian Ji Wang. 2009. "Effects of the 1-Alkyl-3-Methylimidazolium Bromide Ionic Liquids on the Antioxidant Defense System of *Daphnia Magna*." *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72 (6): 1798–1804. <https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2009.05.002>.