

Sara Catarina Pereira Henriques



Avaliação ecotoxicológica e histopatológica dos efeitos decorrentes da exposição aguda
à fenitoína em *Gambusia holbrooki*

Universidade Fernando Pessoa
Faculdade de Ciências da Saúde
Porto, 2011

Sara Catarina Pereira Henriques

Avaliação ecotoxicológica e histopatológica dos efeitos decorrentes da exposição aguda
à fenitoína em *Gambusia holbrooki*

Universidade Fernando Pessoa
Faculdade de Ciências da Saúde
Porto, 2011

Sara Catarina Pereira Henriques

Avaliação ecotoxicológica e histopatológica dos efeitos decorrentes da exposição aguda
à fenitoína em *Gambusia holbrooki*

Monografia apresentada à Universidade Fernando Pessoa
por Sara Henriques, como parte dos requisitos para
obtenção do grau de Licenciado em Ciências Farmacêuticas.

(Sara Catarina Pereira Henriques)

Resumo

A libertação de compostos antropogénicos no meio ambiente tem merecido especial atenção, uma vez que alguns exibem conhecida actividade biológica. Entre os compostos antropogénicos encontrados no meio ambiente, os fármacos são muito frequentemente detectados, e podem ser responsáveis por alterações fisiológicas em organismos expostos. As alterações fisiológicas decorrentes da presença de resíduos de medicamentos nos diversos compartimentos ambientais são hoje em dia tema de pesquisa, em face das alterações eventualmente causadas nos organismos não alvo. Os dados existentes recolhidos em estudos de monitorização com o intuito de avaliar o seu impacto demonstram a presença sistemática destes compostos em compartimentos aquáticos nas mais variadas matrizes ambientais. A fenitoína é um composto farmacoterapêutico utilizado como anticonvulsivante e anti-epilético, habitualmente presente em efluentes domésticos e industriais, como consequência da sua baixa eliminação nas estações de tratamento de águas residuais. Neste trabalho avaliou-se as alterações enzimáticas (actividade das isoenzimas glutationa-S-transferases) e histológicas observadas no fígado e nas brânquias de *Gambusia holbrooki*, após exposições agudas (96 horas) a diversas concentrações deste agente (50; 25; 12,5; 6,25; 3,125 µg/l). A fenitoína esteve relacionada com o aparecimento de lesões histopatológicas tanto nas brânquias como no fígado dos animais expostos. No que concerne à avaliação enzimática, foi possível observar uma diminuição da actividade das isoenzimas GSTs no fígado, o que não aconteceu nas brânquias, tecido no qual não se verificaram alterações significativas relativamente ao grupo controlo.

Agradecimentos

Ao Professor Doutor Bruno Nunes e ao Professor Doutor Alberto Correia gostaria de expressar um profundo reconhecimento pelo apoio e disponibilidade que sempre me prestaram e pela partilha de conhecimentos que foram decisivos para a elaboração deste trabalho. O meu sincero obrigado por todas as horas de trabalho cedidas.

Ao CESAM e ao CIIMAR por me terem disponibilizado todos os recursos materiais dos quais necessitei para a longa elaboração do trabalho e respectivos colaboradores destes centros de investigação científica que prontamente se disponibilizaram para prestar todo o apoio necessário.

À Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Fernando Pessoa e a todos os Professores que fizeram parte do meu percurso académico.

Agradeço à minha Mãe o facto de me ter concedido todas as condições essenciais para o desenvolvimento deste trabalho. Obrigada por me ensinares a acreditar que sou capaz.

A toda a minha Família. Obrigado por terem apoiado as minhas escolhas e pelo valoroso exemplo que sempre deram de excelentes seres humanos e educadores, pelo que serei eternamente grata.

Ao Rui, pelo companheirismo, ajuda e sobretudo paciência para me apoiar nas horas mais difíceis deste percurso. Obrigado por estares sempre a meu lado.

A todos aqueles que, directa ou indirectamente, contribuíram para que a realização deste trabalho fosse possível.

“Todas as substâncias são venenos, não há uma que não seja.
A dose correcta é que diferencia um veneno de um remédio”

Paracelsus
(1493-1541)

Índice

I. Introdução geral	7
II. Fundamentação teórica.....	8
II.1. Compostos farmacêuticos no ambiente	8
II.2. Ecotoxicologia e avaliação ecotoxicológica	12
II.3. Composto neuroactivo - fenitoína	15
II. 4. Biomarcadores de monitorização ambiental	16
II.4.1. Biomarcadores enzimáticos.....	18
II.4.1.1. Biomarcadores de stress oxidativo.....	20
II.4.1.2. Enzimas glutaciona-S-transferases	22
II.4.2. Biomarcadores histopatológicos	23
II.5. Utilização de peixes em estudos ecotoxicológicos.....	25
II.5.1. <i>Gambusia holbrooki</i>	26
III. Objectivos do trabalho	27
IV. Material e métodos.....	27
IV.1. Procedimentos gerais.....	27
IV.1.1. Recolha dos organismos-teste	27
IV.1.2. Manutenção dos organismos-teste.....	28
IV.2. Teste in vitro de exposição aguda	28
IV.3. Determinações.....	30
IV.3.1. Determinações enzimáticas.....	30
IV.3.1.1. Determinação da actividade das enzimas glutaciona S-transferases....	30
IV.3.1.1.1. Determinação da proteína solúvel total.....	30
IV.3.2. Análise histopatológica.....	31
IV.4. Análise estatística.....	32
V. Resultados.....	32
V.1. Determinações enzimáticas.....	32
V.2. Análise histopatológica.....	33
VI. Discussão	35
VII. Conclusão.....	38
VIII. Bibliografia	40

Índice de Figuras

Figura 1. Representação das possíveis vias de introdução de fármacos no ambiente (adaptado de Bila e Dezotti, 2003).....	9
Figura 2. Representação esquemática dos processos constitutivos de um estudo de toxicidade (adaptado de Jemec <i>et al.</i> , 2009).....	14
Figura 3. Estrutura química da fenitoína (adaptado de Yu et al., 2006)	16
Figura 4. Representação esquemática da biotransformação farmacêutica com o intuito de aumentar a polaridade dos compostos (adaptado de Santos <i>et al.</i> , 2010).....	19
Figura 5. Esquema demonstrativo das reacções que ocorrem na redução de oxigénio a água, conduzindo à formação de espécies reactivas de oxigénio como intermediários (adaptado de Scandalios, 2005)	21
Figura 6. Esquema ilustrativo do stress oxidativo, resultante do equilíbrio entre os níveis de antioxidantes (AO) e as espécies reactivas de oxigénio (ERO), (adaptado de Scandalios, 2005)	21
Figura 7. Estrutura química da enzima glutathione s-transferase (adaptado de http://www.jcsg.org/images/stim/3cbu-YP_295234.1.html)	23
Figura 8. Ilustração de um animal pertencente à família <i>Poeciliidae</i> (adaptado de http://www.briancoad.com/species20accounts/Poeciliidae.htm).....	27
Figura 9. Imagem da Pateira de Fermentelos no decurso da recolha dos organismos-teste.....	28
Figuras 10 e 11. Esquema usado para efectuar a exposição dos peixes à fenitoína	29
Figura 12. Imagem das cassetes imersas em reagente de Bouin	31
Figura 13. Imagem do micrótopo no qual se efectuaram os cortes dos blocos de parafina	31
Figura 14 e 15. Imagem relativa à formação dos blocos de parafina e moldes metálicos nos quais os peixes foram colocados.....	31
Figura 16. Efeito da fenitoína na actividade da enzima GST nas brânquias de <i>G. holbrooki</i> . As barras correspondem à média de 4 animais, mais as correspondentes barras de erro padrão	32

Figura 17. Efeito da fenitoína na actividade da enzima GST no fígado de *G. holbrooki*.

As barras correspondem à média de 4 animais, mais as correspondentes barras de erro padrão. *- diferenças significativas comparativamente ao controlo, $p < 0,01$.. 33

Figura 18. Imagem da arquitectura de uma secção de filamentos branquiais de

Gambusia holbrooki. A- Filamentos branquiais de aparência normal (controlo); B- Fusão das lamelas branquiais secundárias (círculo) (controlo); C- Levantamento do epitélio branquial (círculo) (12,5 µg/l); D- Aneurisma (círculo) (6,25 µg/l) 34

Figura 19. Imagem da arquitectura de uma secção de fígado de *Gambusia holbrooki*.

A- sem alterações histopatológicas (controlo); B- vacuolização hepática e presença de núcleos picnóticos (setas) (12,5 µg/l) 34

I. Introdução geral

O consumo de fármacos tem aumentado ao longo do tempo em parte acompanhando o aumento do número de doenças tratáveis com recurso a estes, contribuindo para um aumento da longevidade. Segundo fontes oficiais (Infarmed, 2009) o consumo de medicamentos em Portugal, entre 2005 e 2009, também acompanha esta tendência mundial generalizada de aumento do consumo. O uso indiscriminado de fármacos, sejam eles de venda livre, ou sujeitos a prescrição médica, drogas de abuso e também resíduos de medicamentos veterinários resultam inevitavelmente na sua libertação para o meio ambiente (Daughton e Ternes, 1999).

A poluição ambiental derivada das actividades antropogénicas exige o desenvolvimento de novas metodologias para avaliação, compreensão e prevenção dos efeitos perniciosos da toxicidade dos xenobióticos nos sistemas biológicos (Fent *et al.*, 2006).

De entre os múltiplos compostos encontrados no ambiente, os fármacos de utilização humana assumem particular destaque. São as características intrínsecas dos fármacos, nomeadamente a sua lipofilia, a principal razão porque estes são considerados potencialmente perigosos para a saúde pública e para o ambiente. Para além das suas características intrínsecas, os fármacos reúnem características que os tornam um foco de crescente preocupação do ponto de vista ambiental e de saúde pública: possuem marcada actividade farmacológica, são particularmente resistentes aos processos de metabolização, podem sofrer fenómenos de biomagnificação e bioacumulação, são ambientalmente ubíquos e são libertados em elevadas quantidades para o ambiente normalmente sem qualquer tratamento prévio (Nunes *et al.*, 2004). Os fármacos podem ainda causar efeitos tóxicos sinérgicos quando na presença de outros compostos, o que aumenta a dificuldade de determinar ou prever os seus efeitos ecológicos (Cleuvers, 2003). Contudo, a complexidade da mistura química presente no ambiente aquático e a falta de conhecimento do modo de acção dos diversos compostos nos organismos constituem um obstáculo para a definição de uma gama de concentrações segura de poluentes que pode ser libertada para as águas (Fent *et al.*, 2006)

A necessidade de se compreender e prever os efeitos provocados pelos poluentes no organismo, assim como de se extrapolar os efeitos produzidos por tóxicos em experiências laboratoriais para a população e para a comunidade, tem levado os cientistas a pesquisar por indicadores fisiológicos e bioquímicos de saúde do organismo

e de efeitos de intoxicação a níveis subletais. Assim, por via dos biomarcadores podemos identificar possíveis problemas ambientais antes que a saúde dos sistemas aquáticos seja alterada ou comprometida (Fent *et al.*, 2006).

Os poluentes provenientes da indústria, agricultura e esgotos domésticos podem entrar no ambiente aquático onde interagem com os seres vivos. Estas substâncias podem ser absorvidas e acumular-se no organismo, podendo gerar uma grande variedade de efeitos tóxicos (Ahmad *et al.*, 2006). Os fármacos são geralmente absorvidos pelos humanos ou animais após o seu consumo, sofrendo posteriormente metabolização no organismo, e consequente eliminação. Apesar dos processos metabólicos levados a cabo, frações significativas das substâncias originais são frequentemente excretadas na sua forma não metabolizada, ou sob a forma de metabolitos, via urina ou fezes (Halling-Sørensen, 1998; Daughton e Ternes, 1999), para o meio ambiente ou para os sistemas de tratamento de resíduos. Deste modo, podem ser susceptíveis de escaparem à degradação através dos processos de tratamento nas estações de tratamento de águas residuais (ETARs), sendo eliminados inalterados para o compartimento aquático. Desta forma são normalmente detectados no ambiente, em rios, lagos, estuários, águas do subsolo e por consequência na água destinada ao consumo humano (Fent *et al.*, 2006).

II. Fundamentação teórica

II.1. Compostos farmacêuticos no ambiente

Os compostos farmacêuticos são substâncias persistentes e biologicamente activas, que têm sido reconhecidas como ameaças contínuas à estabilidade ambiental (Fent *et al.*, 2006). No que concerne ao aparecimento de compostos farmacêuticos activos no ambiente aquático, é de salientar que este é um problema emergente da Química Ambiental e da Ecotoxicologia (Halling-Sørensen *et al.*, 1998; Daughton e Ternes, 1999; Heberer, 2002; Fent *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2010).

Os fármacos são desenvolvidos e sintetizados com o intuito de interagir com determinados mecanismos moleculares e metabólicos (ex: receptores celulares, enzimas), tanto em humanos como em animais, podendo demonstrar por vezes efeitos secundários indesejáveis. Contudo, apesar de os compostos farmacêuticos serem geralmente muito específicos no seu modelo de actuação, estes possuem a capacidade

de atingir outros organismos não-alvo (Henschel *et al.*, 1997), e assim podem também apresentar actividade biológica nos organismos não-alvo a eles expostos por via da contaminação ambiental (Fick *et al.*, 2010), induzindo alterações nos organismos selvagens, mesmo quando em concentrações muito baixas. Assim sendo, quando estes fármacos são introduzidos no ambiente podem produzir em animais, nomeadamente peixes e anfíbios, efeitos semelhantes aos que são provocados nos humanos, se estes organismos possuírem mecanismos de metabolização semelhantes ou órgãos e tecidos-alvo similares (Fent *et al.*, 2006; Fick *et al.*, 2010).

O factor principal conducente à contaminação ambiental pelos fármacos é a excreção urinária e fecal, após o seu consumo. Podem contudo considerar-se outros, tais como a eliminação de compostos de diagnóstico, descargas caseiras e descargas poluentes das indústrias farmacêuticas (Zucatto *et al.*, 2000). A actividade agrícola também é responsável pelo aparecimento de compostos farmacêuticos activos nos ambientes aquáticos, nomeadamente por via do uso de produtos veterinários em grandes quantidades, tais como antibióticos e factores de crescimento animal, ou devido à existência de centros de produção animal, que utilizam grandes quantidades de fármacos, principalmente na alimentação dos animais. A aquicultura é também uma fonte considerável de poluição, uma vez que utiliza anti-infecciosos, e anestésicos que são lançados directamente na água (Daughton e Ternes, 1999).

Na figura 1 apresenta-se um resumo esquemático das diferentes vias de introdução de fármacos no ambiente.

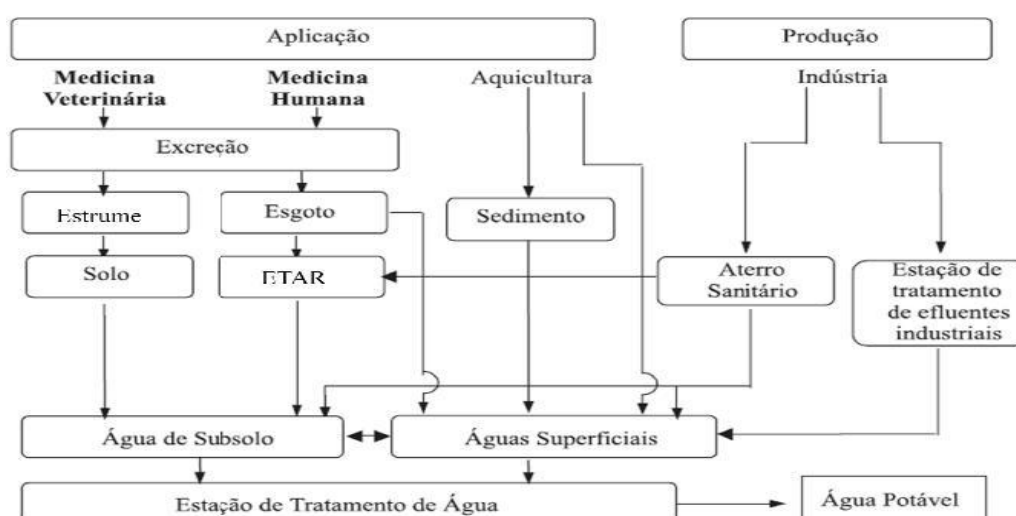


Figura 1. Representação das possíveis vias de introdução de fármacos no ambiente (adaptado de Bila e Dezotti, 2003)

Os fármacos são detentores de diversas propriedades que os tornam propensos a permanecer no ambiente. É necessário ter em linha de conta que os compostos farmacêuticos têm geralmente tempos de semi-vidas longos, o que permite que estes se acumulem ao longo da cadeia alimentar, atingindo quantidades significativas e biologicamente activas (Zuccato *et al.*, 2000). São maioritariamente lipofílicos, sendo por isso facilmente absorvidos através das membranas biológicas; são persistentes e bioacumuláveis, pelo que podem exercer a sua actividade biológica ao longo de períodos alargados de tempo, e apresentam baixos índices de degradação (Nunes *et al.*, 2008). É ainda importante ter em consideração que é pouco provável que os fármacos com actividade no ambiente exerçam actividade isoladamente. Ou seja, muitos deles poderão ter actividade aditiva ou até mesmo sinérgica com outros fármacos também presentes no ambiente, o que acarreta um risco acrescido de efeitos de toxicidade ambiental (Cleuvers, 2003). Deve acrescentar-se ainda que os mecanismos de acção dos fármacos não são, até à data, bem conhecidos ou compreendidos em muitos organismos, e que o mesmo composto pode actuar de formas diferentes, aspecto que dificulta as análises toxicológicas em organismos não humanos (Fent *et al.*, 2006).

Coloca-se ainda outra questão relativamente aos medicamentos. Estes são, na sua maioria, misturas racémicas, isto é, misturas de vários isómeros do mesmo composto. No entanto, para uma substância activa específica, apenas um dos isómeros é o responsável pelos efeitos terapêuticos desejados. Os restantes isómeros são geralmente inactivos, embora possam ser responsáveis pela maioria dos efeitos secundários dos respectivos medicamentos. Neste sentido, a nova tendência da indústria farmacêutica, é produzir medicamentos contendo apenas isómeros puros (Daughton e Ternes, 1999). Além dos factores de ordem médica, este procedimento iria reduzir de forma significativa a quantidade de resíduos de medicamentos introduzidos no ambiente (Daughton e Ternes, 1999).

Nas últimas décadas, o aumento do consumo de medicamentos levou a um aumento da produção dos mesmos e conseqüentemente à produção de resíduos associados aos medicamentos fora de uso (Infarmed, 2009).

A partir de meados dos anos 90, com os avanços das técnicas de detecção analítica, o interesse na quantificação destes compostos no ambiente cresceu (Fent *et al.*, 2006). Progressos efectuados no sentido de desenvolver métodos novos e mais sensíveis, tornou possível a detecção e quantificação de fármacos no meio aquático, na ordem de ng/l (Petrović *et al.*, 2003). Hoje em dia é assim possível destacar quais são as

classes terapêuticas mais relevantes na contaminação do meio ambiente (Kümmerer, 2001; Benotti *et al.*, 2009). Os compostos farmacêuticos mais vulgarmente detectados no ambiente são: analgésicos e fármacos anti-inflamatórios, antibacterianos, bloqueadores-beta, reguladores de trigliceridemias, meios de contraste, citostáticos, contraceptivos orais e fármacos antiepilépticos, embora outras classes sejam igualmente reportadas de forma consistente (Fent *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2010).

Em estudos já levados a cabo em diversos países concluiu-se que mais do que 500 compostos farmacêuticos, bem como diversos metabolitos foram detectados em ambiente aquático (Heberer, 2002; Fick *et al.*, 2010). Estes dados são úteis para estabelecer quais as substâncias activas mais relevantes para que sejam determinados os seus efeitos toxicológicos. Contudo, para um número considerável de fármacos as ETARS não são eficazes na sua remoção, ou seja, as suas concentrações à saída podem ser da ordem dos 97–98% da concentração de entrada nas mesmas, pelo que são lançados em grande quantidade no ambiente aquático. Estima-se que, em termos gerais, cerca de 90% dos resíduos dos fármacos sejam lançados para os rios/zonas costeiras após o tratamento (Ternes, 1998).

No que concerne aos fármacos antiepilépticos, existem estudos publicados que comprovam o aparecimento deste tipo de substâncias nos esgotos municipais, que mais tarde irão surgir nos efluentes lançados para o compartimento aquático. É o caso da carbamazepina em amostras de efluentes de ETARs municipais e de águas superficiais (Heberer, 2002). A primidona, também já foi detectada em amostras de efluentes de ETARs e águas superficiais em concentrações superiores a 635 ng/l (Heberer, 2002).

Os afluentes de ETARs domésticas e industriais seguem normalmente um conjunto de tratamentos, nomeadamente o pré-tratamento, tratamento primário, secundário e, em alguns casos, o tratamento terciário, durante o qual, os resíduos de medicamentos podem sofrer uma degradação microbiana de substâncias em compostos de menor peso molecular (Suarez *et al.*, 2008). Após o tratamento, o efluente proveniente das ETARs é lançado directamente para o ambiente aquático, onde os fármacos que tenham sido modificados durante o tratamento podem ser novamente convertidos a formas activas (Ternes, 1998).

A degradação microbiológica dos compostos nas estações de tratamento de águas residuais é o principal meio de eliminação destas substâncias antes da sua libertação para o compartimento aquático. Apesar dos microorganismos em ETARs terem sido expostos nos últimos anos à presença de resíduos de medicamentos, e verem

assim a sua capacidade metabólica induzida/aumentada, a sua capacidade de remoção neste processo é limitada (Daughton e Ternes, 1999). Este fenómeno deve-se primeiramente ao facto de estes microorganismos estarem sujeitos a concentrações muito baixas de fármacos, dado que a introdução de compostos farmacêuticos diariamente no ambiente é muito pequena e variável. Outro factor responsável pela limitada degradação por parte dos microorganismos é a introdução em larga escala de novos medicamentos no mercado todos os anos, alguns dos quais de categorias químicas completamente novas. Este fenómeno induz uma variação tão significativa no tipo de medicamentos que são recebidos à entrada da ETAR que a capacidade de remoção destes compostos poderá ser nula (Daughton e Ternes, 1999).

A remoção de compostos em ETARs depende ainda de fenómenos externos. Foi demonstrado, por exemplo, que para alturas do ano mais húmidas, a taxa de remoção de certos compostos numa ETAR é reduzida drasticamente, pelo menos para a maioria dos anti-inflamatórios não esteróides, evidenciando assim que as condições climáticas, nomeadamente a precipitação afectam directamente as taxas de remoção de resíduos de medicamentos por parte das ETARs (Ternes 1998).

Em suma, o contínuo processo de libertação de fármacos para o ambiente resulta na sua presença sistemática no ambiente, principalmente no compartimento aquático (Fent *et al.*, 2006). Deste modo, os compostos de utilização farmacêutica caracterizam-se por uso contínuo e indiscriminado, e por uma elevada actividade biológica no ambiente (Halling-Sørensen *et al.*, 1998; Daughton e Ternes, 1999; Jones *et al.*, 2002). Apesar da ocorrência de fármacos no ambiente aquático ser comum, tanto os seus efeitos a longo prazo como as suas consequências para o ambiente são ainda pouco conhecidos e motivo de investigação activa (Nunes *et al.*, 2005; Fent *et al.*, 2006). Apesar dos diversos estudos publicados no que concerne a este tema, ainda não existem dados concretos relativos ao grau efectivo de contaminação dos ambientes aquáticos (Henchel *et al.*, 1997).

II.2. Ecotoxicologia e avaliação ecotoxicológica

Desde o primeiro uso da palavra “Ecotoxicologia” nos anos 70, o termo tem sido definido como o estudo dos efeitos dos contaminantes antropogénicos nos sistemas ecológicos (Truhaut, 1977). Desde então tornou-se uma preocupação considerar o

impacto que os agentes tóxicos teriam, em larga escala, nos ecossistemas e assim nas últimas décadas, a investigação das questões relacionadas com a exposição ambiental a xenobióticos tem aumentado, tendo-se vindo a conhecer a multiplicidade de efeitos sobre os sistemas biológicos.

Surgiu então a necessidade de elucidar o conceito de toxicidade, que está associado à resposta de um organismo a uma dose de determinado composto, que é mantida acima de uma concentração limite após um período de exposição (Walker *et al.*, 2001). Em Ecotoxicologia consideram-se efeitos directos de toxicidade, os que se relacionam com características de sobrevivência, reprodução, distribuição e abundância de uma espécie. No que concerne aos efeitos indirectos, podem referir-se modificações na cadeia alimentar, nomeadamente alteração do tipo de presa de uma dada espécie, em consequência do comportamento de fuga de uma outra espécie ser afectada por um determinado tóxico, ou ainda a alteração de uma presa por modificação na sua abundância, ou mesmo por esta ter desaparecido do ecossistema, devido ao aumento da sua taxa de mortalidade ou diminuição da sua reprodução, efeito derivado da exposição a um dado contaminante tóxico (Preston, 2002).

A avaliação dos efeitos dos tóxicos sobre os ecossistemas aquáticos é uma tarefa importante, uma vez que estes sistemas são os locais mais afectados por contínuas descargas de contaminantes ambientais, tais como os fármacos (Nunes *et al.*, 2005). Torna-se então necessário criar baterias de testes ecotoxicológicos com o intuito de compreender os mecanismos tóxicos associados aos fármacos libertados para o meio ambiente, e compreender os efeitos que os seus metabolitos surtirão por si só (Fent *et al.*, 2006). Com o intuito de responder a esta problemática efectuam-se avaliações de toxicidade ambiental. Ao longo das últimas décadas, os testes de toxicidade em ambiente aquático têm vindo a aumentar de complexidade, surgindo novos ensaios, novos parâmetros indicativos de toxicidade, e testes onde são incorporadas novas espécies, tanto de peixes, como moluscos e crustáceos (Nunes *et al.*, 2005). Os testes de toxicidade são procedimentos efectuados com o intuito de detectar e quantificar os efeitos de uma ou mais substâncias, resíduos ou factores ambientais num determinado período de tempo sobre um organismo. Para tal usam-se as respostas dadas por organismos expostos a esses mesmos compostos, que indicam quais as vias envolvidas na resposta tóxica (Walker *et al.*, 2001).

De um modo geral, avaliam-se efeitos observados após a realização de testes tanto agudos como crónicos, com o intuito de prever uma possível resposta. Os testes

ecotoxicológicos podem assim ser agudos (testes de curta duração) ou crônicos (testes de longa duração) (Fent *et al.*, 2006). Os testes de toxicidade aguda proporcionam rápidas respostas na estimativa dos efeitos letais de um agente tóxico sobre os organismos, e caracterizam-se pelo curto tempo de exposição, que geralmente varia entre as 24 a 96 horas, e ocorrem para concentrações usualmente elevadas de uma determinada substância química (Walker *et al.*, 2001). No entanto, a relevância dos testes crônicos é superior, pois reflectem um cenário mais aproximado da realidade, em que os organismos são expostos frequentemente durante períodos muito longos aos contaminantes ambientais. Nos testes de toxicidade crônica, o tempo de exposição envolve períodos mais longos (podendo abranger parte ou todo o ciclo de vida do organismo), com concentrações sub-letais. A escolha dos parâmetros a avaliar depende do tipo de estudo que se pretende desenvolver (Walker *et al.*, 2001). Assim sendo, é necessário efectuar testes mais longos se se pretender efectivamente avaliar de forma mais realista o risco ambiental que um determinado composto apresenta (Fent *et al.*, 2006). Os danos causados nas populações são por vezes difíceis de detectar, uma vez que muitos desses efeitos tendem a manifestar-se após longos períodos de tempo, e quando finalmente os efeitos se tornam claros, o processo deletério já pode estar num ponto onde não há forma de reverter a situação e reduzir o risco (van der Oost *et al.*, 2003).

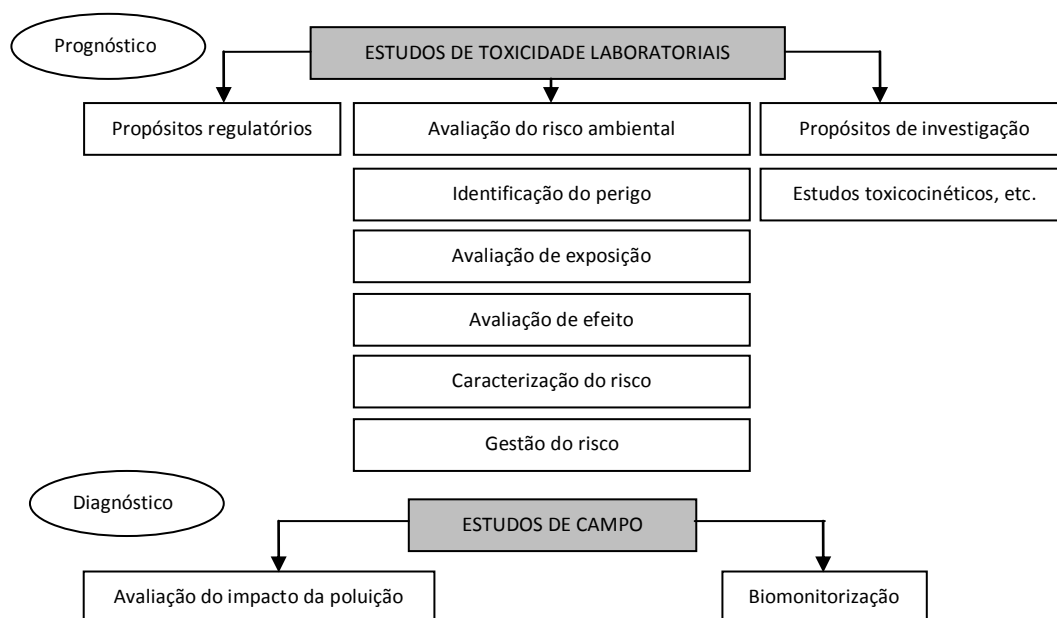


Figura 2. Representação esquemática dos processos constitutivos de um estudo de toxicidade (adaptado de Jemec *et al.*, 2009)

O principal obstáculo dos estudos de avaliação ecotoxicológica reside no facto de os organismos individuais funcionarem como unidades discretas, e assim sendo é necessário efectuar extrapolações para ser possível descrever os efeitos tóxicos na população, na comunidade e no ecossistema (Fent *et al.*, 2006). É também necessário ter em linha de conta que num ecossistema existe uma grande diversidade de interações entre espécies, e deste modo se uma determinada espécie for afectada por um tóxico, existe uma grande possibilidade de, directa ou indirectamente, outras espécies que com esta interação ou da qual dependem serem também afectadas (Preston, 2002). A relação entre a sensibilidade e a relevância ecológica das respostas utilizadas em Ecotoxicologia estão directamente relacionadas com o encadeamento dos diversos níveis de organização biológica (Burton, 1991), uma vez que respostas aos tóxicos adquirem maior significado biológico quando se estabelecem relações entre as alterações sub-individuais e os efeitos que se encontrariam em níveis de organizacionais superiores (Burton, 1991; Peakall, 1992).

II.3. Composto neuroactivo - fenitoína

A fenitoína é um fármaco neuroactivo e anti-convulsivante e como tal, actua sobre o sistema nervoso central. Desde a sua introdução em 1938, a fenitoína tem sido um antiepiléptico de primeira linha no tratamento desta disfunção neurológica. (Guimarães *et al.*, 2006).

Calcula-se que existam 70 milhões de epiléticos em todo o mundo, sendo todos os dias diagnosticados novos casos (Ngugi *et al.*, 2011). A epilepsia é uma patologia complexa caracterizada por convulsões recorrentes, que são episódios limitados de disfunção cerebral resultado de descargas anormais dos neurónios cerebrais alterados metabolicamente (Guimarães *et al.*, 2006).

Os fármacos antiepilépticos podem ser agrupados de acordo com o respectivo mecanismo de acção. Os principais grupos incluem os bloqueadores dos canais de sódio dependentes da voltagem, inibidores das correntes de cálcio, potenciadores do GABA (ácido gama-aminobutírico), antagonistas do glutamato, inibidores da anidrase carbónica e hormonas (Guimarães *et al.*, 2006). A fenitoína bloqueia o influxo de sódio através dos canais de sódio dependentes da voltagem durante a fase de despolarização dos potenciais de acção. Os fármacos como a fenitoína, que têm como alvo estes canais previnem o retorno dos canais ao estado activo, estabilizando-os na forma inactiva.

Actuando desta forma, estes fármacos evitam o disparo repetitivo dos neurónios (Guimarães *et al.*, 2006).

No que concerne à sua metabolização, a fenitoína é extensivamente metabolizada no fígado a 5 - (p-hidroxifenil) - 5 fenilhidantoína (HPP), que é um metabolito inactivo. Esta hidroxilação da fenitoína é levada a cabo pelo complexo citocromo P450 (Veronese *et al.*, 1991, 1993).

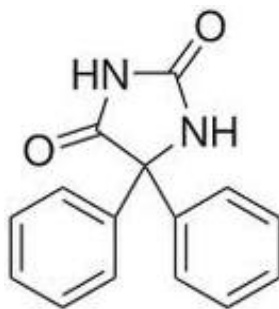


Figura 3. Estrutura química da fenitoína (adaptado de Yu *et al.*, 2006)

II. 4. Biomarcadores de monitorização ambiental

Os biomarcadores podem ser descritos como alterações bioquímicas, histológicas ou fisiológicas, induzidas por contaminantes e que podem ser mensuráveis num sistema ou amostra biológica (Timbrell, 1998).

A definição de biomarcador surge comumente associada a duas características predominantes: a sua sensibilidade e rápida resposta, que contribuem para a detecção prévia e rápida dos efeitos de um determinado tóxico nos organismos, mesmo antes de estes efeitos serem observáveis e ainda serem capazes de fornecer dados acerca da relação entre a exposição ao contaminante e uma resposta biológica (Morgan *et al.*, 1999). A utilização de biomarcadores permite ainda obter um entendimento mecanístico ou de causa-efeito dos processos toxicológicos. Adicionalmente, esta estratégia apresenta uma vantagem, relativamente à monitorização química, que resulta do facto dos resultados integrarem eventuais interacções toxicológicas que podem ocorrer na sequência da exposição a misturas de contaminantes (van der Oost *et al.*, 2003).

Os biomarcadores podem ser usados para várias finalidades, dependendo do objectivo do estudo, do tipo de exposição e da interacção da substância química com os receptores biológicos (Heberer, 2002). A sua versatilidade como ferramentas de análise ambiental já foi demonstrada em vários estudos efectuados, em organismos distintos

(peixes, mamíferos, moluscos, plantas, crustáceos e insectos), nos quais podem ser monitorizados parâmetros específicos, consoante o propósito do estudo em causa (Nunes *et al.*, 2005, 2006). Estes dão informação sobre os efeitos biológicos dos contaminantes ao invés de uma mera quantificação dos seus níveis ambientais; assim, mesmo estando em concentrações vestigiais é possível quantificar e tipificar efeitos biológicos. Os biomarcadores fornecem uma visão do potencial mecanismo do poluente que provoca efeitos nos organismos. Ao avaliar múltiplos biomarcadores, é possível obter informações importantes sobre o estado do organismo exposto relativamente ao processo tóxico sofrido. Uma situação de stress químico causada por poluentes normalmente desencadeia uma cascata de respostas biológicas, onde cada uma dessas respostas pode, em teoria, servir como biomarcador (McCarthy *et al.*, 1991). O uso de biomarcadores compila assim uma vasta gama de vantagens, tais como: baixo custo, simplicidade de procedimentos associados, aplicabilidade sob as mais variadas condições de teste e ainda sensibilidade para um elevado número de contaminantes ambientais (Timbrell, 1998).

Os biomarcadores podem ser divididos em três classes: a) biomarcadores de exposição, que abrangem a detecção e quantificação de um composto exógeno, dos seus metabolitos ou da interacção entre este e moléculas ou células alvo, sendo medidos num compartimento do organismo; b) biomarcadores de efeito, que compreendem alterações bioquímicas e fisiológicas, e assim podem ser mensuráveis nos tecidos ou fluídos corporais e associados a possíveis patologias; e por fim os c) biomarcadores de susceptibilidade, que apontam a capacidade de um organismo modificar a susceptibilidade a uma exposição, envolvendo nomeadamente factores genéticos (Timbrell, 1998; van der Oost *et al.*, 2003).

Contudo, existem outras classificações de biomarcadores distintas, nomeadamente uma que adopta uma perspectiva fisiológica (Peakall, 1992) d) biomarcadores de neurotoxicidade (como por exemplo o estudo da actividade da enzima acetilcolinesterase); e) biomarcadores de stress oxidativo, (recorrendo por exemplo à actividade da enzima superóxido dismutase); f) biomarcadores de imunotoxicidade (medindo a concentração de imunoglobulinas); g) biomarcadores histopatológicos (observando danos tecidulares, tais como tumores); h) biomarcadores de biotransformação (recorrendo à avaliação de alterações na actividade de enzimas); e i) biomarcadores de genotoxicidade, biomarcadores que avaliam a disrupção endócrina (medindo níveis hormonais), entre outros.

A selecção do bioindicador apropriado a um determinado estudo ecotoxicológico deve ter em conta os objectivos específicos da biomonitorização (Zhou *et al.*, 2008). Na escolha do biomarcador é necessário que sejam tidas em consideração, as características do organismo, as condições ambientais em teste, a resposta esperada, o(s) tóxico(s) a analisar, a via de exposição, a duração da exposição em função dos tóxicos e respectivas concentrações (Nunes *et al.*, 2008).

Deste modo, o teste laboratorial para quantificar o biomarcador deve ser fiável, económico e fácil de executar; deve ser sensível à exposição aos tóxicos; deve permitir distinguir entre a variabilidade natural e as alterações provocadas pelos tóxicos contaminantes; o impacto dos factores que possam causar alterações nas respostas do biomarcador deve ser conhecido; o mecanismo subjacente das relações entre o biomarcador e a exposição ao poluente (nomeadamente a dose e o tempo de resposta) devem ser conhecidos; e por fim, a ou as relações entre a resposta do biomarcador e qual o impacto que terá no organismo a longo termo (van der Oost *et al.*, 2003).

II.4.1. Biomarcadores enzimáticos

Dados recentes indicam que alterações nos níveis de determinadas enzimas podem ser usadas como biomarcadores em diferentes organismos aquáticos (Livingstone, 1991; Regoli *et al.*, 2002). Tal utilização assenta no papel único que muitas enzimas envolvidas no processo de destoxificação têm como indicadoras de interacções entre o sistema fisiológico e compostos tóxicos.

A alteração da estrutura química das moléculas no processo de biotransformação dá origem a outras entidades químicas designadas por metabolitos. Apesar de existirem excepções, regra geral os metabolitos são moléculas mais hidrossolúveis do que os fármacos que lhes dão origem, sendo por consequência mais facilmente excretáveis. Na prática os metabolitos costumam apresentar uma maior polaridade, maior quantidade de grupos funcionais hidrofílicos e maiores dimensões relativamente ao fármaco original, o que acaba por dificultar a sua passagem através das membranas biológicas.

As reacções de biotransformação são categorizadas, não somente pela natureza da reacção envolvida (oxidação, redução, etc.), mas, também pela sequência habitual com que elas ocorrem. Assim sendo, as reacções catalisadas por enzimas biotransformadoras de xenobióticos são classificadas em reacções de fase I (ou pré-sintéticas) e reacções de fase II (sintéticas ou de conjugação) (Guimarães *et al.*, 2006).



Figura 4. Representação esquemática da biotransformação farmacêutica com o intuito de aumentar a polaridade dos compostos (adaptado de Santos *et al.*, 2010)

A fase I compreende um conjunto de reacções de oxidação, redução e hidrólise que preparam os xenobióticos para as reacções da fase II. Essas reacções, geralmente, modificam a estrutura química da substância mediante adição de um grupo funcional, o que resulta num pequeno aumento da hidrofilia e polaridade (Guimarães *et al.*, 2006).

As reacções de biotransformação de fase II, também chamadas de reacções de conjugação, incluem diversos processos, que passam pela conjugação com substratos endógenos. Nas reacções de conjugação formam-se compostos altamente polares e hidrossolúveis que são então capazes de ser excretados pelos rins ou pela bília (Guimarães *et al.*, 2006). Os principais compostos endógenos envolvidos nas reacções de conjugação são aminoácidos e respectivos derivados, tais como a glicina e a cisteína; carboidratos e seus derivados, especialmente o ácido glicurônico e ainda se pode dar a conjugação com compostos simples como, por exemplo, o sulfato e o acetato. As reacções de conjugação mais comuns são, conjugação com ácido glucurónico, conjugação com sulfato, conjugação com aminoácidos e conjugação com a glutatona, sendo este o processo mais relevante. Nesta reacção, o tripéptido glutatona (ácido glutâmico-glicina-cisteína), através do seu grupo sulfidrílico, une-se a um carbono eletrofílico do agente tóxico. A reacção é catalisada pelas isoenzimas glutatona-S-transferases (Guimarães *et al.*, 2006).

Um outro aspecto a referir no âmbito da biotransformação é a interacção que pode resultar da exposição conjunta de um determinado organismo a várias substâncias. Quando tal acontece, podem surgir fenómenos de indução enzimática, ou seja, aumento da capacidade metabólica resultante de uma estimulação específica da síntese de certos sistemas enzimáticos, ou ainda fenómenos de inibição enzimática, que se traduzem numa diminuição da capacidade metabólica (Guimarães *et al.*, 2006). Estas respostas adaptativas podem servir então para indicar que o organismo esteve exposto a um dado ambiente químico, servindo as alterações da actividade destas enzimas como biomarcadores de avaliação dessa mesma exposição.

Embora a biotransformação possa ocorrer em diversos órgãos, tais como o rim, intestino ou pulmão, o fígado é o órgão principal, não só pela diversidade enzimática presente nos microssomas hepáticos, mas também pela importância quantitativa da sua massa e pelo elevado fluxo sanguíneo que por ele passa (Guimarães *et al.*, 2006).

II.4.1.1. Biomarcadores de stress oxidativo

Diversos estudos revelaram que a exposição a contaminantes em ecossistemas aquáticos pode promover a produção intracelular de espécies reactivas de oxigénio, as quais poderão conduzir a uma situação de stress oxidativo nos sistemas biológicos (Livingstone 1991).

A presença de radicais livres nos sistemas biológicos foi descoberta há mais de cinco décadas, e foi de imediato associada a diversas patologias e ao envelhecimento. Tornou-se notório que os efeitos deletérios dos radicais livres poderiam ser controlados através do recurso a agentes antioxidantes, e deste modo, o metabolismo dos radicais livres nos sistemas biológicos tem sido um aspecto sobre o qual os investigadores se têm debruçado atentamente nos últimos anos (Halliwell e Gutteridge, 1989; Livingstone, 1991).

O conceito de stress oxidativo define-se como uma condição biológica em que ocorre desequilíbrio entre a produção de espécies reactivas de oxigénio e a sua destoxificação através de sistemas biológicos que as removam ou que reparem os potenciais danos celulares por elas causados (Halliwell e Gutteridge, 1989). O equilíbrio intracelular entre substâncias oxidantes e redutoras garante um estado redox ideal para a homeostasia. Este equilíbrio redox é alcançado por várias vias, incluindo a presença de compostos endógenos capazes de receber ou doar electrões de acordo com o ambiente redox da célula. Em termos químicos, o stress oxidativo consiste num aumento significativo do potencial de redução celular, tornando-se menos negativo, ou numa diminuição significativa da capacidade redutora de pares redox celulares, como por exemplo a glutatona. Um aspecto particularmente destrutivo do stress oxidativo é a produção de espécies reactivas de oxigénio, como radicais livres e peróxidos (Halliwell e Gutteridge, 1989).

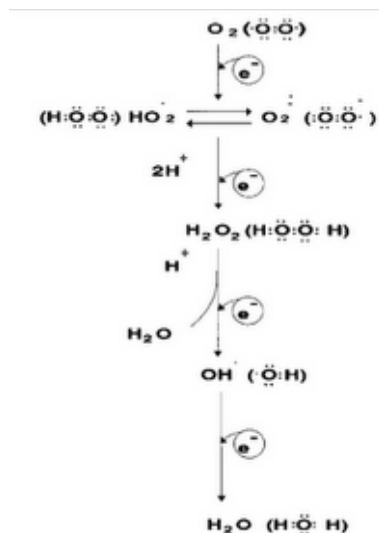


Figura 5. Esquema demonstrativo das reacções que ocorrem na redução de oxigénio a água, conduzindo à formação de espécies reactivas de oxigénio como intermediários (adaptado de Scandalios, 2005)

A protecção do organismo contra substâncias oxidantes pode ser efectuada através de moléculas redutoras designadas por antioxidantes. Estas definem-se como quaisquer moléculas que quando presentes, mesmo em pequenas concentrações, atrasam ou impedem a oxidação de substratos oxidáveis (Halliwell e Gutteridge, 1989).

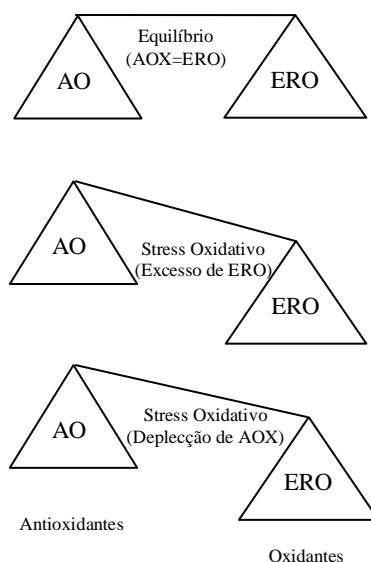


Figura 6. Esquema ilustrativo do stress oxidativo, resultante do equilíbrio entre os níveis de antioxidantes (AO) e as espécies reactivas de oxigénio (ERO), (adaptado de Scandalios, 2005)

O principal dano induzido pelas espécies reativas de oxigénio resulta nas alterações das macromoléculas celulares, tais como lípidos de membranas (a

peroxidação lipídica) DNA e/ou proteínas. Os danos resultantes podem contribuir para a alteração do funcionamento celular, através das alterações nas concentrações intracelulares de cálcio, alterações no pH, conduzindo eventualmente à morte celular (Davies, 1995). Assim, pode concluir-se que o stress oxidativo dá-se aquando da ocorrência de três factores: aumento de espécies reactivas de oxigénio, debilidade dos sistemas de defesa antioxidante e incapacidade de reparação do stress oxidativo (Dorval e Hontela, 2003). Para evitar este cenário existem as defesas antioxidantes do organismo. No caso de as defesas antioxidantes estarem diminuídas, o organismo poderá estar exposto a altos níveis de espécies reactivas de oxigénio, o que irá conduzir a danos oxidativos dos componentes celulares, tais como os lípidos (peroxidação lipídica), proteínas e DNA (Halliwell e Gutteridge, 1989; Dorval e Hontela, 2003).

O interesse do stress oxidativo no campo da Ecotoxicologia está relacionado com o “paradoxo do oxigénio”. Esta molécula é fundamental para muitos processos bioquímicos em organismos aeróbios (Dorval e Hontela, 2003). Contudo, o consumo desta molécula tem como consequência a formação intracelular de espécies reactivas de oxigénio potencialmente tóxicas (Regoli *et al.*, 2002). Apesar do facto de a produção de radicais livres de oxigénio ser normalmente contra-atacada por um sistema antioxidante complexo, é sabido que diversos poluentes de origem ambiental estimulam a produção intracelular de espécies reactivas de oxigénio, através de diversos mecanismos, incluindo o ciclo redox e do metabolismo oxidativo dependente do complexo enzimático citocromo P450, entre outros (Halliwell e Gutteridge, 1989; Livingstone, 1991). Para avaliação de parâmetros de stress oxidativo é comum recorrer ao estudo das actividades de diversas enzimas, tais como a superóxido dismutase, catalase, glutathione reductase, glutathione peroxidases e glutathione-S-transferases (Regoli *et al.*, 2002).

II.4.1.2. Enzimas glutathione-S-transferases

As glutathione-S-transferases (GST) representam uma família de enzimas que actuam como catalisadores para a conjugação de diversos compostos electrofílicos com o tripéptido glutathione, tornando a sua eliminação mais facilitada (Gulick e Fahl 1995; Armstrong, 1997; Halliwell e Gutteridge, 1999). Utilizando a glutathione, estas enzimas participam em reacções de destoxificação que contribuem para a transformação de uma vasta gama de compostos, tais como fármacos e contaminantes ambientais (Habig *et al.*,

1974; Réndon-von Osten *et al.*, 2005). As GSTs são compostas por proteínas diméricas solúveis e multifuncionais que se podem conjugar com moléculas electrofílicas, de modo a torná-las menos tóxicas (Habig *et al.*, 1974). Uma vez que estas enzimas desempenham um papel importante na biotransformação tanto de xenobióticos como de substâncias endógenas, as quantificações da actividade destas enzimas tem sido usadas como biomarcador da exposição a xenobióticos com centros electrofílicos (Falkner e Clark, 1992; Gallagher *et al.*, 1992).

Para além de actuarem como biomarcador de conjugação, as GST assumem um papel relevante como biomarcadores de stress oxidativo. A expressão desta enzima pode ser regulada por alterações na concentração de espécies reactivas de oxigénio, sugerindo que as células desenvolveram um mecanismo sensível à presença destes compostos (Cengiz e Ünlü, 2003).

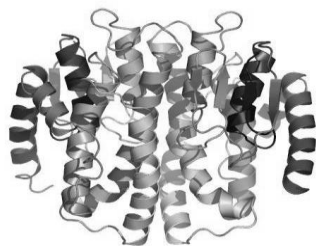


Figura 7. Estrutura química da enzima glutatona s-transferase (adaptado de http://www.jcsg.org/images/stim/3cbu-YP_295234.1.html)

II.4.2. Biomarcadores histopatológicos

As alterações histopatológicas têm sido amplamente usadas como biomarcadores na avaliação do estado de saúde de alguns organismos aquáticos, em particular os peixes, expostos a contaminantes e as análises providenciam informação vital para a descrição de lesões celulares e tecidulares (Hinton *et al.*, 1992; Handy *et al.*, 2002). A histopatologia fornece dados sobre lesões a níveis tecidulares, sem contudo especificar a causa pontual da lesão, ou seja, não diagnostica a contaminação, mas sim a resposta biológica à agressão (Ayas *et al.*, 2007).

Uma das grandes vantagens do uso de biomarcadores histopatológicos na monitorização ambiental é que esta categoria de biomarcadores permite examinar órgãos-alvo específicos, nomeadamente as brânquias e o fígado de peixes (Handy *et al.*, 2002; Cengiz e Ünlü, 2006). As alterações histológicas aparecem usualmente como uma

resposta aos efeitos sub-letais, sendo um método eficaz para detectar os efeitos perniciosos em vários tecidos e órgãos, decorrentes sobretudo de exposições crônicas a determinados xenobióticos (Bernet *et al.*, 1999). Muitas alterações persistem mesmo após a exposição ao composto tóxico ter terminado, ou seja, são irreversíveis (Hinton, 1994).

As brânquias e o fígado são os órgãos mais usados para avaliar a poluição aquática (Bernet *et al.*, 1999; Cengiz e Ünlü, 2006). As brânquias são órgãos multifuncionais envolvidos nas trocas gasosas, equilíbrio ácido-base, transporte de iões e excreção nos peixes (Jagoe *et al.*, 1996). As brânquias são também o primeiro local de contacto do xenobiótico com o organismo (Cengiz e Ünlü 2006), e possuem uma elevada área de superfície e localização externa (Jagoe *et al.*, 1996). Devido à sua localização anatómica e ao contacto directo com o meio ambiente, as brânquias indicam o estado de poluição ou contaminação da água na qual os peixes estão colocados (Cengiz e Ünlü, 2006; Fernandes *et al.*, 2008). As lesões provocadas nas brânquias em consequência da exposição a contaminantes podem ser traduzida em danos significativos na saúde do peixe (Cengiz e Ünlü, 2006). De uma forma geral, as alterações morfológicas nelas ocorridas, estão correlacionadas com as alterações ocorridas nos processos fisiológicos, ou processos de toxicidade (Laurent *et al.*, 1985).

O fígado é um dos órgãos mais sensíveis a alterações bioquímicas, fisiológicas e estruturais após a exposição a vários tipos de poluentes ambientais (Giari *et al.*, 2007; Carrola *et al.*, 2009). Vários estudos sugerem a utilização do tecido hepático de peixes como biomarcador histopatológico, pois este órgão demonstra ser uma ferramenta útil na avaliação da qualidade da água e do papel dos contaminantes aquáticos nos ecossistemas (Lang *et al.*, 2006). O fígado desempenha um papel importante em funções vitais dos peixes, nomeadamente no metabolismo, transformação, acumulação e excreção de contaminantes (Cengiz e Ünlü 2006; Carrola *et al.*, 2009). Devido à sua abundância enzimática, o fígado é o órgão mais importante no processo de biotransformação, e na consequência deste processo, assume um papel proeminente nos processos de destoxificação (Braunbeck, 1998). A sua posição interposta na circulação porta-hepática faz com que este seja um dos órgãos mais afectados pelos contaminantes da água, sobretudo daqueles que entram por via da alimentação (Camargo e Martinez, 2007). As células hepáticas têm um papel fundamental em diversas funções essenciais para a sobrevivência dos peixes, tais como, no metabolismo de proteínas, lípidos e hidratos de carbono. Servem, também, de local de armazenamento para muitos

nutrientes como a glucose. Além disso, estão envolvidas no processo de hematopoiese, na produção de anticorpos e na secreção biliar (Melo *et al.*, 2004). Por estas razões, o fígado responde rapidamente à presença de poluentes no compartimento aquático, demonstrando prontamente alterações estruturais e funcionais (Figueiredo-Fernandes *et al.*, 2006).

II.5. Utilização de peixes em estudos ecotoxicológicos

A selecção de uma espécie que sirva plenamente os propósitos do estudo é determinante para o sucesso de uma avaliação de ecotoxicidade. Para um organismo ser considerado um organismo teste adequado, deve ser sensível e não resistente; deve ser uma espécie representativa de um determinado local; apresentar uma elevada abundância e distribuição, para que seja possível repetir amostragens; deve apresentar uma longevidade que permita comparação entre diferentes idades; ser de fácil amostragem e manutenção laboratorial; estar colocada numa posição importante na cadeia alimentar e finalmente apresentar uma boa relação dose-efeito (Peakall, 1992).

Os peixes representam o grupo de vertebrados mais antigo e diversificado e ocupam uma variada gama de *habitats* desde oceanos, mares, rios, lagos, etc. (Bolis *et al.*, 2001). Os peixes têm vindo a ser utilizados em ensaios ecotoxicológicos nos mais diversos estudos (e.g. Peakall, 1992; Bolis *et al.*, 2001; Graham e Sloman, 2004).

Um dos factores pelos quais os ecotoxicologistas recorrem a peixes relaciona-se com o facto de estes serem organismos sentinela de significativa utilidade, que permitem detectar efeitos contaminantes ambientais e, assim sendo, são usados como sistemas modelo eficientes e rentáveis (Bolis *et al.*, 2001). A exposição prolongada destes animais a contaminantes pode induzir uma sequência de alterações comportamentais, funcionais e fisiológicas que prejudicam as funções vitais, como a capacidade dos mesmos para a procura de alimentos, capacidades de fuga a predadores ou mesmo funções reprodutivas (Van der Oost *et al.*, 2003).

Uma das dificuldades mais importantes dos estudos que recorrem a peixes está relacionada com a falta de especificidade das lesões e alterações provocadas por um contaminante ou classe de contaminantes, o que prejudica, a avaliação da causa-efeito, quando estão envolvidos vários tóxicos. Por outro lado, as patologias ao nível dos tecidos estão melhor descritas na espécie humana do que nos peixes, podendo, em

alguns casos, surgir discrepâncias, quer na terminologia, quer na identificação das lesões (Gül *et al.*, 2004).

II.5.1. *Gambusia holbrooki*

Neste estudo utilizou-se a espécie dulçaquícola *Gambusia holbrooki*, (n.v. peixe mosquito) que pertence à família *Poeciliidae* (Cabral e Marques, 1999).

Esta espécie tem a designação de “espécie invasora” de acordo com o Decreto-Lei 565/99 de 21 de Dezembro. Entende-se como “espécie invasora” uma espécie susceptível de, por si própria, ocupar o território de uma forma excessiva, em área ou em número de indivíduos, provocando uma modificação significativa nos ecossistemas.

Deste modo, *G. holbrooki*, foi transportada para um ecossistema que não era o seu de origem e rapidamente aumentou o seu efectivo populacional visto adaptar-se muito bem a ambientes hostis e condições adversas, tais como temperaturas elevadas e águas pouco oxigenadas. São organismos de comportamento predatório muito voraz, e assim capazes de se alimentar da própria descendência (Cabral e Marques, 1999).

Esta é uma espécie de reduzidas dimensões, com dimorfismo sexual evidente (Cabral e Marques, 1999). *G.holbrooki* é uma espécie eurialina, ou seja, é capaz de suportar variações de salinidade da água, sem que daí advenham graves consequências para o seu metabolismo (Nunes *et al.*, 2008). Este organismo é de fácil manutenção laboratorial, pelo que um grande número de peixes pode ser colocado num pequeno aquário ou tanque devido ao seu pequeno tamanho corporal, que varia entre os 2 e 2,5 cms de comprimento (Nunes *et al.*, 2008).

Apesar do facto de peixes pequenos não providenciarem quantidades avultadas de tecidos para a quantificação de biomarcadores, o uso da *G. holbrooki* em Ecotoxicologia prende-se com as suas características intrínsecas, bem como com as condições nas quais esta espécie pode ser mantida e testada. Estas características fazem com que esta espécie seja considerada adequada para um modelo animal em Ecotoxicologia (Nunes *et al.*, 2008).

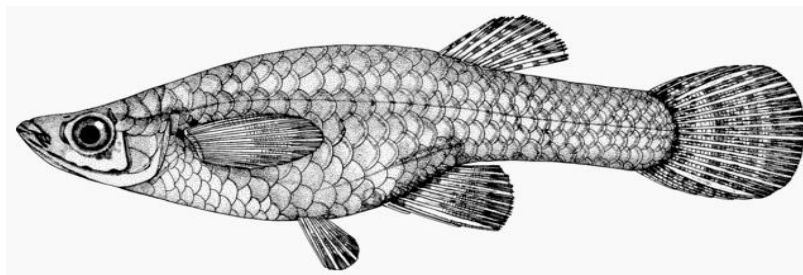


Figura 8. Ilustração de um animal pertencente à família *Poeciliidae* (adaptado de <http://www.briancoad.com/species20accounts/Poeciliidae.htm>)

III. Objectivos do trabalho

O objectivo central deste trabalho foi proceder a uma avaliação da toxicidade ambiental do fármaco psicoactivo fenitoína nas brânquias e fígado de *Gambusia holbrooki* após exposição aguda. Deste modo avaliaram-se as respostas e efeitos biológicos em *G. holbrooki* provocados pela exposição aguda a várias concentrações de fenitoína, com recurso à quantificação da actividade das enzimas glutathione S-transferases e ao registo das alterações histopatológicas observadas nas brânquias e no fígado dos indivíduos expostos.

IV. Material e métodos

IV.1. Procedimentos gerais

IV.1.1. Recolha dos organismos-teste

Os peixes foram capturados na Pateira de Fermentelos durante o mês de Junho de 2010, com uma rede de camaroeiro, sem seriação de género sexual. Foram seleccionados peixes com dimensões aproximadas de 2 a 2,5cm. Os animais foram colocados em arcas térmicas com água proveniente da Pateira de Fermentelos para serem transportados para o laboratório.

A Pateira de Fermentelos (40° 34' 48 N, 8° 31' 12 W) é uma lagoa natural, localizada no triângulo dos concelhos de Águeda, Aveiro e Oliveira do Bairro, antes da confluência do Rio Cértima com o Rio Águeda. Também recebe o refluxo das águas dos referidos rios, na época das cheias. É circundada pelas freguesias de Óis da Ribeira,

Fermentelos, Espinhel e Requeixo (Ahmad *et al.*, 2006). Esta é a maior lagoa natural da Península Ibérica. É uma zona muito rica em fauna, flora e espécies aquáticas. É assim um ecossistema biologicamente activo com um papel significativo no ciclo de vida de diversos organismos que contribuem para a subsistência de outros, nomeadamente peixes (Ferreira *et al.*, 2003).



Figura 9. Imagem da Pateira de Fermentelos no decurso da recolha dos organismos-teste

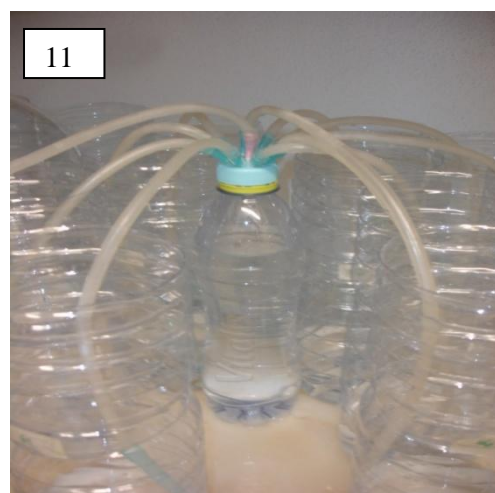
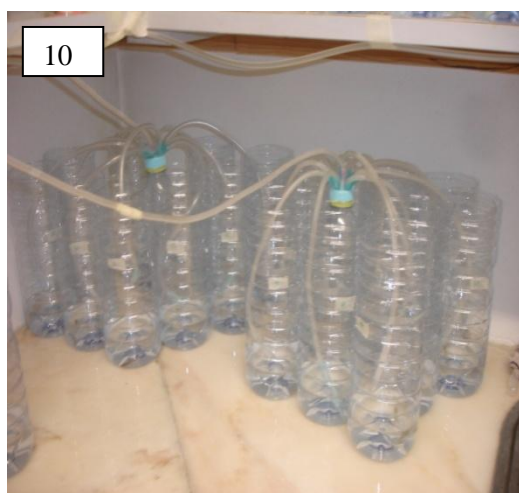
IV.1.2. Manutenção dos organismos-teste

Os peixes foram temporariamente mantidos num tanque de plástico com água previamente desclorinada e aerificação durante 15 dias (período de quarentena). A água foi mantida a uma temperatura controlada de $20\pm 1^{\circ}\text{C}$, sujeita a arejamento contínuo, à qual se adicionou cloreto de sódio (6 g/l) com o intuito de minimizar qualquer probabilidade de contaminação fúngica. O fotoperíodo foi de 16h de luz contra 8h de escuridão.

Os tanques foram limpos diariamente e retiraram-se os peixes mortos para evitar contaminações (Nunes *et al.*, 2004). Os peixes foram alimentados *ad-libitum* diariamente com ração comercial (Sera Vipar®).

IV.2. Teste in vitro de exposição aguda

O desenho experimental usado para efectuar este teste seguiu as orientações da OECD (OECD, 1993). Os peixes foram expostos à fenitoína em tanques individuais, sujeitos a arejamento, contendo cada um deles 200 ml de água desclorinada.



Figuras 10 e 11. Esquema usado para efectuar a exposição dos peixes à fenitoína

Foram usados 6 peixes por concentração, incluindo para o tratamento controlo, escolhidos aleatoriamente para este efeito, de modo a obter-se amostra biológica em quantidade suficiente para levar a cabo as determinações tanto enzimáticas como histológicas. Uma solução stock de fenitoína foi preparada com etanol, devido à baixa solubilidade deste composto. As concentrações testadas foram de 50, 25, 12,5, 6,25 e 3,125 $\mu\text{g/l}$. Estas foram escolhidas tendo em conta a concentração de 250 $\mu\text{g/l}$, reportada por Yu *et al.*, (2006). Todas as concentrações são derivadas da atrás descrita, sendo assim concentrações subletais. Foi incluído um tratamento controlo, no qual os animais foram unicamente expostos a água desclorinada. As condições de temperatura, fotoperíodo e arejamento foram idênticas ao período de quarentena. Não foi fornecido qualquer alimento aos peixes durante a fase de exposição, que durou 96h. A observação foi feita às 0, 24, 48, 72 e 96 h. O meio foi renovado ao fim de 48 horas.

Após o término do período de exposição os animais foram sacrificados por decapitação, em gelo com tampão fosfato. Retiraram-se posteriormente as brânquias e os fígados que foram homogeneizados em tampão fosfato (200 mM, pH=7) com 0,1% Triton X-100 e colocados em tubos de eppendorf. Previamente às análises enzimáticas, as amostras foram congeladas a -80°C . Para a análise histológica os peixes foram seleccionados aleatoriamente e colocados, ainda vivos, dentro de cassetes, devidamente rotuladas. A estes peixes foi retirada uma parte da barbatana caudal com o intuito de facilitar a penetração do fixador químico.

IV.3. Determinações

IV.3.1. Determinações enzimáticas

As amostras foram homogeneizadas com tampão fosfato 50 mM, pH=7 com Triton X-100 0,1%. Os tecidos homogeneizados foram centrifugados a 15000G durante 10 minutos a uma temperatura de 4°C (Nunes *et al.*, 2008).

IV.3.1.1. Determinação da actividade das enzimas glutathione S-transferases

Após o descongelamento das amostras foram efectuadas as diluições respectivas a cada tecido a estudar. Para tal usou-se tampão fosfato 50 mM pH=7 com Triton X-100 0,1%.

As isoenzimas GSTs catalisam a conjugação do substrato cromogénico CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno) com a glutathione, formando-se um tioéter cuja formação pode ser espectrofotometricamente avaliada pelo incremento da absorvância a um comprimento de onda de 340 nm. Os resultados expressam-se em nanomoles do tioéter produzidas por minuto por miligrama de proteína (Habig *et al.*, 1974). A actividade das GSTs foi então determinada por espectrofotometria de acordo com o protocolo definido por Habig (Habig *et al.*, 1974) adaptada a microplaca.

IV.3.1.1.1. Determinação da proteína solúvel total

A quantificação da proteína foi efectuada usando o método de Bradford (Bradford, 1976), adaptado a uma microplaca de 96 poços de modo a expressar as actividades enzimáticas por miligrama de proteína, usando globulina bovina como padrão, de modo a expressar a actividade enzimática tendo em conta o conteúdo de proteína contida nos tecidos analisados. A actividade enzimática é expressa em função da determinação da proteína total dado que esta determinação funciona como critério uniformizador. Esta reacção envolve a ligação de um corante (reagente de Bradford) à proteína total, dando origem a um complexo corado estável, passível de ser quantificado a 595nm. Esta determinação foi efectuada em quadruplicado.

IV.3.2. Análise histopatológica

O processamento histológico consistiu em mergulhar os peixes inteiros em solução de Bouin durante 24 horas para fixação química (Figura 12). Foram posteriormente descalcificados, desidratados através de uma série de soluções de álcool com graduações crescentes (70%, 80%, 90% e 100%), embebidos em parafina (Figuras 14 e 15) e seccionados (5-7 μm) num micrótomo manual rotativo no plano lateral (Figura 13). As secções foram coradas com hematoxilina-eosina e examinadas por microscopia óptica convencional. Foram realizadas microfotografias com recurso a uma câmara digital.



Figura 12. Imagem das cassetes imersas em reagente de Bouin

Figura 13. Imagem do micrótomo no qual se efectuaram os cortes dos blocos de parafina



Figura 14 e 15. Imagem relativa à formação dos blocos de parafina e moldes metálicos nos quais os peixes foram colocados

IV.4. Análise estatística

Após se terem verificado os pressupostos da distribuição normal e homogeneidade dos dados, os resultados das análises enzimáticas foram comparados por intermédio de uma análise de variância unifactorial, seguida de um teste de Dunnet para discriminar as diferenças significativas em relação ao controlo. O nível de significância (α) adoptado foi 0,05.

V. Resultados

V.1. Determinações enzimáticas

No caso das brânquias (Figura 16) verifica-se não haver uma tendência marcada quer de aumento ou diminuição da actividade enzimática. Não há valores significativamente diferentes em relação ao controlo ($F=0,48$; d.f.=5,12; $p>0,05$).

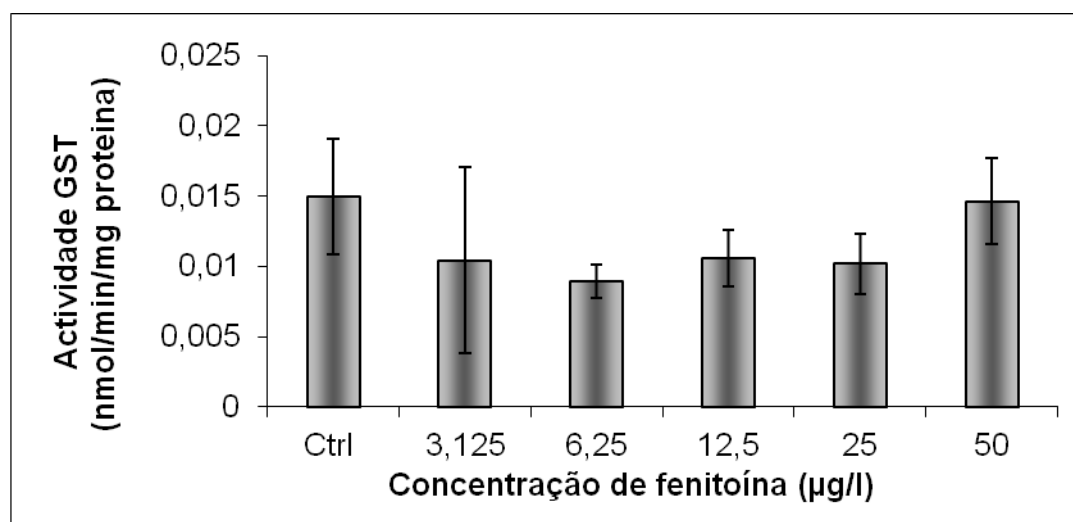


Figura 16. Efeito da fenitoína na actividade da enzima GST nas brânquias de *G. holbrooki*. As barras correspondem à média de 4 animais, mais as correspondentes barras de erro padrão

Após a observação da Figura 17, podemos constatar que os valores da actividade da GST no fígado são influenciados pela exposição a fenitoína, pois a actividade enzimática neste tecido está diminuída comparativamente com o controlo ($F=5,05$; g.l.= 5, 10; $p<0,01$).

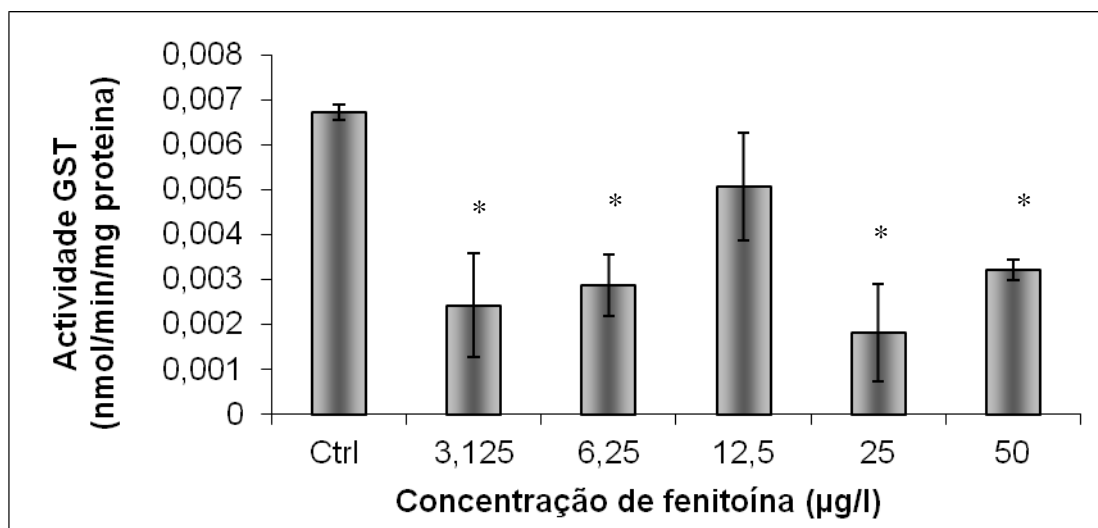
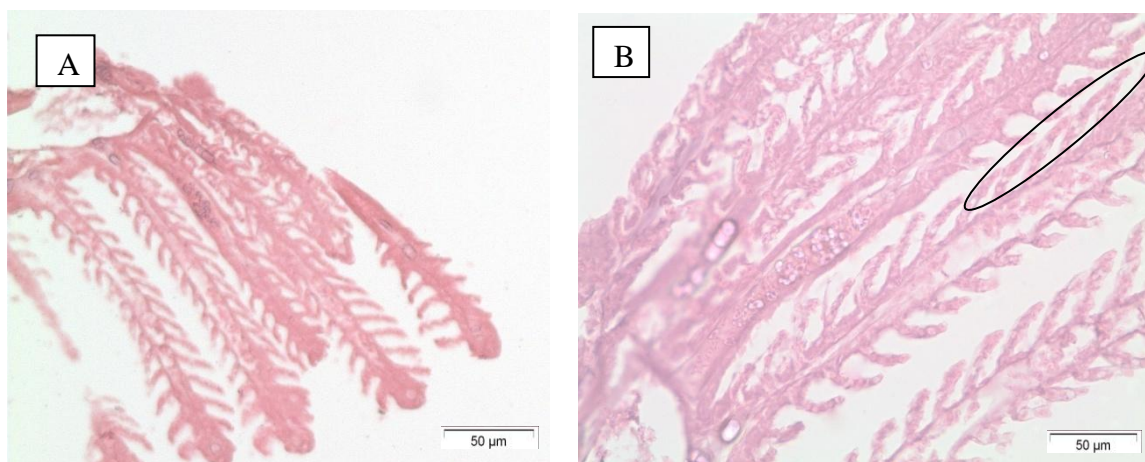


Figura 17. Efeito da fenitoína na actividade da enzima GST no fígado de *G. holbrooki*. As barras correspondem à média de 4 animais, mais as correspondentes barras de erro padrão. *- diferenças significativas comparativamente ao controlo, $p < 0,01$

V.2. Análise histopatológica

Após a exposição aguda de *G. holbrooki* a diferentes concentrações de fenitoína verificou-se, de uma forma generalizada, incluindo alguns exemplares do grupo controlo, a ocorrência de alterações histopatológicas, tais como, levantamento epitelial (Figura 18 C), fusão das lamelas secundárias (Figura 18 B) associada a hiperplasia epitelial e alguns aneurismas (Figura 18 D).



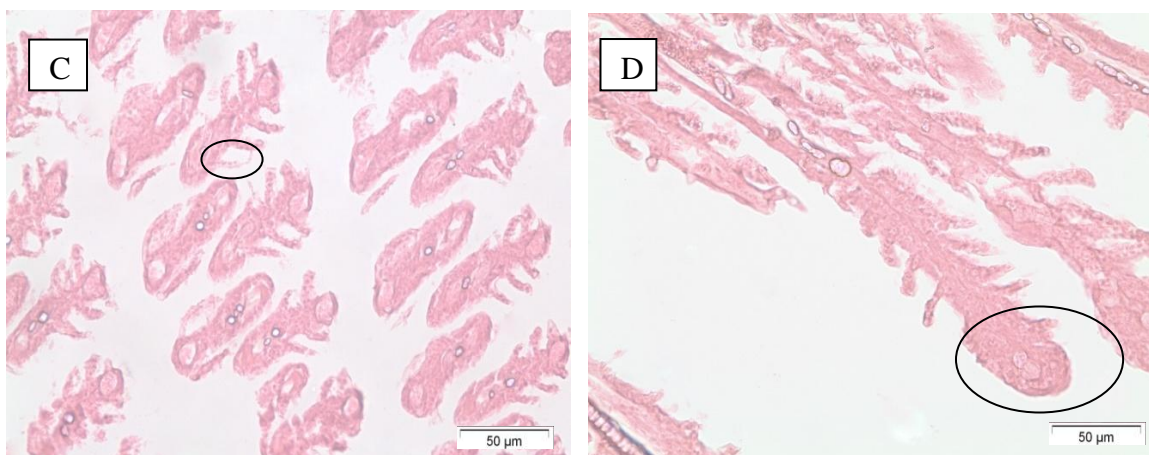


Figura 18. Imagem da arquitetura de uma secção de filamentos branquiais de *Gambusia holbrooki*. A- Filamentos branquiais de aparência normal (controle); B- Fusão das lamelas branquiais secundárias (círculo) (controle); C- Levantamento do epitélio branquial (círculo) (12,5 µg/l); D- Aneurisma (círculo) (6,25 µg/l)

Em alguns peixes do controle, o tecido hepático apresentou uma arquitetura normal, apesar de serem passíveis de detecção sinais ligeiros de vacuolização, sinais comuns à maioria dos fígados observados (Figura 19 A). A exposição crônica de *Gambusia holbrooki* a diferentes concentrações de fenitoína nas condições experimentais definidas não causou alterações qualitativas significativas relativamente ao grupo controle. Foram encontradas alterações tais como vacuolização hepática a presença de núcleos picnóticos (Figura 19 B).

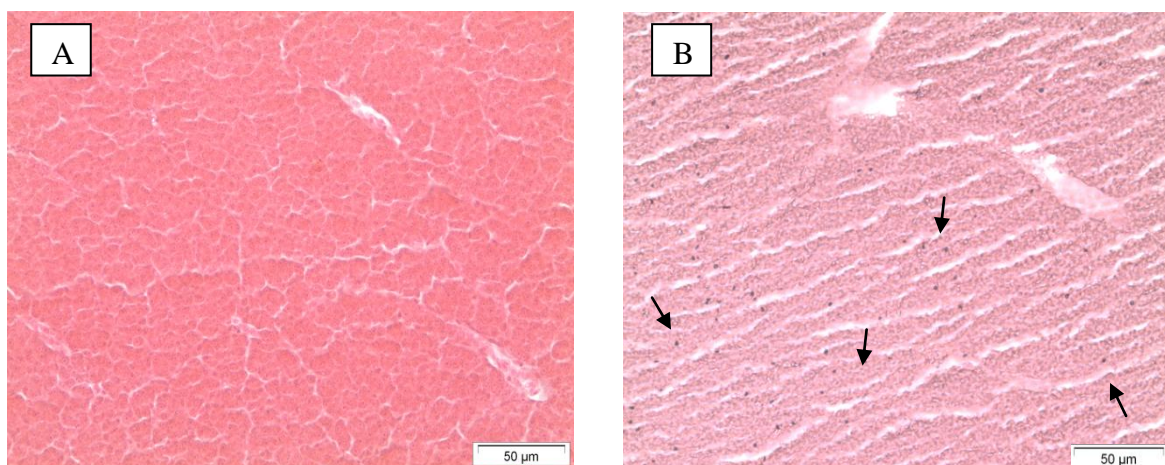


Figura 19. Imagem da arquitetura de uma secção de fígado de *Gambusia holbrooki*. A- sem alterações histopatológicas (controle); B- vacuolização hepática e presença de núcleos picnóticos (setas) (12,5 µg/l)

VI. Discussão

Diversos estudos relatam efeitos provocados pelos fármacos em peixes, como por exemplo, inibição da actividade de enzimas-chave (Nunes *et al.*, 2006) ou alterações histológicas (Cengiz e Ünlü 2003; Cengiz e Ünlü 2006; Ayas *et al.*, 2007; Fernandes *et al.*, 2007; Bernet *et al.*, 2009; Costa *et al.*, 2009).

A utilização da actividade das GSTs neste trabalho prendeu-se com o facto de esta ser considerada simultaneamente uma ferramenta de avaliação de stress oxidativo, dado que a expressão desta enzima pode ser regulada por alterações na concentração de espécies reactivas de oxigénio (Cengiz e Ünlü 2003), e ainda devido ao facto de esta ser uma enzima de conjugação (uma vez que cataliza a adição de substractos electrofílicos, muitos deles produtos do stress oxidativo à glutatona (Amicarelli *et al.*, 2000).

Nas brânquias a variação da actividade da GST não parece estar relacionada com a presença da fenitoína uma vez que não se verificou haver uma tendência marcada quer de aumento quer de diminuição da actividade enzimática. O facto de não haver resultados significativos nas brânquias, pode dever-se ao facto do teste efectuado ter sido agudo, o que não proporcionou tempo suficiente para que o fármaco exercesse alterações tóxicas. Alternativamente as concentrações testadas poderiam não ser suficientemente elevadas para causar alterações significativas na actividade da GST neste órgão.

Valores aumentados de actividade da enzima GST estão relacionados com o início de um processo de defesa dos organismos com o intuito de lidar com os compostos nocivos aos quais estão expostos, nomeadamente com o aumento dos níveis de radicais livres de oxigénio ou necessidade de biotransformação de metabolitos lesivos (Hayes *et al.*, 2005). Neste trabalho verificou-se uma diminuição da actividade da enzima GST, o leva a crer que a fenitoína não provocou um cenário de stress oxidativo em *Gambusia holbrooki*. Uma vez que não houve um aumento da actividade desta enzima, é possível concluir que não deva ter ocorrido um processo metabólico envolvendo a conjugação com a glutatona (Dautremepuits *et al.*, 1999).

São escassas as evidências de diminuição da actividade das enzimas GSTs provocadas por fármacos em peixes. Contudo, diversos estudos reportam alterações análogas provocadas por outros agentes nocivos. Martinez-Lara *et al.*, (1996) também reportou uma diminuição da actividade das enzimas GSTs no peixe *Sparus aurata* após a exposição a poluentes, sugerindo que estes resultados poderiam ter surgido em

consequência da inactivação das enzimas GSTs por parte das espécies reactivas de oxigénio formadas aquando do metabolismo dos poluentes.

Ao efectuar-se uma análise qualitativa das alterações histopatológicas das alterações encontradas, tanto nas brânquias como no fígado, não se detectaram quaisquer diferenças significativas entre os grupos controlo e os grupos de teste nas diferentes concentrações, sugerindo uma acção relativamente inócua destas concentrações de fenitoína nos animais expostos para o tempo de exposição utilizado.

As alterações mais visíveis nos indivíduos expostos foram levantamento epitelial e a fusão das lamelas secundárias. Estas alterações histológicas, podem ser um mecanismo de protecção ou defesa uma vez que estas alterações fazem com que haja uma diminuição da área de superfície das brânquias, reduzindo-se portanto o contacto com o agente tóxico (Richmonds e Dutta, 1989). Contudo, estas alterações não são específicas e podem ser induzidas por diferentes contaminantes (Mallat *et al.*, 1985). Como consequência do aumento da distância entre água e sangue, devido à elevação epitelial, o consumo de oxigénio é comprometido. (Camargo e Martinez, 2007). Muitos agentes químicos, físicos e biológicos podem produzir alterações histológicas no tecido branquial (Leonardo *et al.*, 2001). A formação dos aneurismas observados pode estar relacionada com a ruptura das células pilar devido ao aumento do fluxo sanguíneo ou até devido aos efeitos directos de contaminantes nessas células. Este é um tipo de lesão grave, da qual também é possível recuperar, mas mais dificilmente do que das alterações epiteliais (Camargo e Martinez, 2007).

À semelhança, do que acontece para os biomarcadores enzimáticos são poucos os dados que relatam as alterações histológicas encontradas em consequência da acção lesiva de medicamentos ou seus metabolitos. Contudo, há diversas publicações que reportam resultados concordantes com as alterações encontradas neste estudo. Coutinho e Gokhle (2000) observaram levantamentos epiteliais nas brânquias de carpas (*Cyprinus carpio*) e tilápias (*Oreochromis mykiss*) expostas ao efluente de uma estação de tratamento de águas residuais; alterações similares também foram descritas para peixes expostos a metais e contaminantes orgânicos (Camargo e Martinez, 2007); um estudo elaborado por Cengiz e Ünlü (2003) na avaliação histológica do dano causado por um insecticida (malatião) no tecido branquial de *Gambusia affinis* demonstrou ser um eficaz bioindicador de exposição e efeito; outro estudo de avaliação de efeito de um tensioactivo aniónico a nível histopatológico em tecido branquial, em *Solea*

senegalensis, evidenciou fenómenos de fusão lamelar, edema intraepiteal, levantamento de camadas epiteliais (Álvarez-Muñoz *et al.*, 2009).

Relativamente à avaliação histológica do fígado, esta provou não ser uma ferramenta extraordinariamente sensível para revelar os processos adaptativos e os efeitos prejudiciais nos animais induzidos por poluentes orgânicos.

Diversos são os trabalhos que conseguiram observar e quantificar alterações histológicas significativas do fígado em peixes no decurso de uma exposição a xenobióticos: Cengiz e Ünlü (2006) e Costa *et al.*, (2009) e observaram vacuolização, proliferação e hipertrofia dos sinusóides e por fim polimorfismos do núcleo (e.g. núcleos picnóticos e hipertrofiados) após uma exposição aguda a deltametrin e malatião; na espécie *Gobiocypris rarus* observaram-se diversas alterações (acumulação lipídica no citoplasma, hipertrofia dos hepatócitos, aumento do tamanho nuclear) após exposição a etinilestradiol (Zha *et al.*, 2007); e no peixe *Clarias gariepinus* o tecido hepático sofreu aumento do tamanho dos hepatócitos, aumento do tamanho do núcleo, observaram-se núcleos picnóticos e vacuolização após exposição a um herbicida (glifosato) (Olurin *et al.*, 2006).

Neste trabalho, e na maioria dos peixes controlo, o parênquima hepático encontrava-se normal, sem sinais aparentes de alterações histológicas (i.e. hepatócitos bem definidos e poliédricos, citoplasma sem inclusões e núcleos com tamanho e morfologia normais). Contudo nalguns indivíduos expostos foram detectados sinais de ligeira vacuolização hepática, que provavelmente pode ter sido causada por acumulação de glicogénio, lípidos ou água nos hepatócitos. No entanto, a vacuolização é uma resposta inespecífica e comum a diversos compostos químicos (Pacheco e Santos, 2002; Liao *et al.*, 2006; Camargo e Martinez, 2007). Ou seja, a avaliação histológica do fígado, provou não ser uma ferramenta sensível para revelar os processos adaptativos e os efeitos prejudiciais nos animais induzidos por poluentes orgânicos, em particular para o caso da fenitoína; provavelmente o tempo de exposição e/ou a gama de concentrações do fármaco poderá não ter sido suficiente para induzir alterações tecidulares significativas nos indivíduos expostos.

Devido às propriedades bioactivas dos fármacos e da sua contínua libertação para o ambiente, a avaliação do risco ecotoxicológico privilegia os estudos crónicos em detrimento dos agudos devido aos resultados relacionados com a persistência de um tóxico na cadeia alimentar e bioacumulação (Carlsson *et al.*, 2006). Contudo, a informação fornecida pelos testes crónicos é mais complexa, uma vez que consegue dar

acesso a dados que reflectem vários tipos de organização, como por exemplo os efeitos na reprodução e nos mecanismos farmacológicos, que são os que estão em falta para a maioria dos compostos farmacêuticos, onde se inclui a fenitoína (Carlsson *et al.*, 2006).

VII. Conclusão

Os ensaios de toxicidade realizados em ambiente laboratorial, são ferramentas imprescindíveis na previsão/avaliação de possíveis danos ambientais e na implementação de limites legais de contaminantes presentes no meio ambiente. No entanto, nos últimos anos têm surgido novos bioensaios como resposta à necessidade de ferramentas ecotoxicológicas rápidas, sensíveis e, ao mesmo tempo, ecologicamente relevantes (Fent *et al.*, 2006). Actualmente é possível concluir que o uso humano de compostos farmacêuticos não é completamente inócuo para o ambiente. Com o aumento da consciencialização para esta problemática têm sido levados a cabo diversos estudos com o intuito de detectar de forma mais precisa as quantidades efectivas destes compostos no ambiente.

Vários estudos já efectuados demonstraram que as estações de tratamento de águas residuais não são eficazes, e muitos fármacos passam quase inalterados (Petrović *et al.*, 2003), evidenciando a sua presença no compartimento aquático. É possível concluir que há uma necessidade urgente em melhorar a eficácia das estações de tratamento de águas, no que concerne à eficácia na remoção de medicamentos ou seus resíduos das águas, diminuindo ao máximo a quantidade em que estes se detectam à saída destas estações de tratamento. É consensual que esta problemática é relevante dado que os fármacos são compostos bioactivos, e assim capazes de causar efeitos potenciais nos sistemas vivos; há um aumento contínuo e global do seu consumo, o que origina um consequente aumento da libertação destes para o meio ambiente; centenas de fármacos são usados regular e simultaneamente, o que potencia a possibilidade de ocorrerem interacções e efeitos sinérgicos ainda desconhecidos (Cleuvers, 2003), e por fim, dados relativos aos efeitos nos sistemas aquáticos resultantes da exposição a doses baixas a fármacos estão ainda em falta (Kümmerer, 2001; Benotti *et al.*, 2009).

A exposição de peixes a contaminantes pode induzir lesões diversas em diferentes órgãos chave do metabolismo, tais como as brânquias e o fígado. A avaliação histológica demonstrou ser um bom biomarcador para ser usado na avaliação das

alterações ao nível tecidual em peixes expostos à fenitoína, mesmo em concentrações sub-letais como as usadas no presente trabalho, uma vez que foram encontradas alterações histopatológicas nas brânquias e no fígado dos espécimes expostos à fenitoína. No que concerne à avaliação enzimática, foi possível observar uma diminuição da actividade da enzima GST no fígado, o que não aconteceu nas brânquias, tecido no qual não se verificaram alterações significativas relativamente ao grupo controlo.

Os resultados obtidos neste estudo sugerem que a espécie *G. holbrooki* evidencia uma sensibilidade adequada, sendo um bom organismo-teste para a monitorização da contaminação dos ambientes aquáticos por fármacos.

Porém, é pertinente referir que o período de exposição seleccionado foi reduzido para que se pudessem tirar conclusões precisas relativamente às alterações fisiológicas e bioquímicas provocadas pela exposição à fenitoína. A realização de um ensaio crónico ao invés de um ensaio agudo, deverá ser um critério a adoptar em trabalhos futuros, assim como a inclusão da análise de outros tecidos, e do estudo integrado de outros biomarcadores de nível bioquímico/metabólico.

É ainda importante salientar que as concentrações dos fármacos encontradas nas águas de superfície são, de um modo geral, inferiores às que são detentoras de capacidade para causar toxicidade aguda em organismos aquáticos. O confronto entre exposições agudas e crónicas para vários fármacos, revelou que os efeitos ecotoxicológicos crónicos não podem ser correlacionados com os efeitos agudos (Carlsson *et al.*, 2006). Contudo, apesar de ser possível os animais sofrerem efectivamente os efeitos de uma exposição aguda, será mais provável que no meio ambiente ocorram exposições crónicas a tóxicos. (Nunes *et al.*, 2008), que têm um maior potencial para numerosos efeitos nefastos subtis, como por exemplo, alterações metabólicas ou reprodutivas em organismos que não são os alvos primários (Daughton e Ternes, 1999).

VIII. Bibliografia

Álvarez-Muñoz, D., Gómez-Parra, A., Blasco, J., Sarasquete, C., González-Mazo, E. (2009). Oxidative stress and histopathology damage related to the metabolism of dodecylbenzene sulfonate in Senegalese sole. *Chemosphere*. **74**, 1216-1223.

Ahmad, I., Pacheco, M., Santos, M. (2006). *Anguilla anguilla* L. oxidative stress biomarkers: An in situ study of freshwater wetland ecosystem (Pateira de Fermentelos, Portugal). *Chemosphere*. **65**, 952-962.

Amicarelli, F., Tiboni, G., Colafarina, S., Bonfigli, A., Iammarrone, E., Miranda, M. (2000). Antioxidant and GSH-Related Enzyme Response to a Single Teratogenic Exposure to the Anticonvulsant Phenytoin: Temporospacial Evaluation. *Teratology*. **62**, 100-107.

Armstrong, N. (1997). Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. *Chemical Research in Toxicology*. **10**, 2-18.

ASTM. (1980). Standard practice for conducting acute toxicity tests with fishes, macroinvertebrates and amphibians. Report E-790-80, *American Society for Testing and Materials*.

Ayas, Z., Ekmekci, G., Ozmen, M., Yerli, V. (2007). Histopathological changes in the livers and kidneys of fish in Sariyar Reservoir, Turkey. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. **23**, 242-249.

Benotti, J., Trenholm, A., Vanderford, B., Holady, J., Stanford, B., Snyder S. (2009). Pharmaceuticals and endocrine disrupting compounds in U.S. drinking water. *Environmental Science and Technology*. **43**, 597-603.

Bernet, D., Schmidt, H., Buckhardt-Holm, P., Wahli, T. (1999). Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *Journal of Fish Diseases*. **22**, 25-34.

Bila, M., Dezotti, M. (2003). Fármacos no meio ambiente. *Química Nova*. **26**, 523-530.

Bolis, L., Piccolella, M., Valle, D., Rankin, C. (2001). Fish as model in pharmacological and biological research. *Pharmacological Research*. **44**, 265-277.

Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytic Biochemistry*. **72**, 248-254.

Briancoad. [em linha]. Disponível em <http://www.briancoad.com/species%20accounts/Poeciliidae.htm> [Consultado em 21/08/2011].

Braunbeck, T. (1998). Cytological alterations in fish hepatocytes following in vivo and in vitro sublethal exposure to xenobiotics - structural biomarkers of environmental contamination. *Braunbeck, T., Hinton, E., Streit, B. (Eds.). Fish Ecotoxicology*. Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland 61-140.

Burton, G. (1991). Assessing the toxicity of freshwater sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry*. **10**, 1585-1627.

Cabral, A., Marques, C. (1999). Life history, population dynamics and production of eastern mosquitofish, *Gambusia holbrooki*, in rice fields of the lower Mondego River Valley, western Portugal. *Acta Oecologica*. **20**, 607-620.

Camargo, M., Martinez, C. (2007) Histopathology of gills, kidney and liver of a neotropical fish caged in an urban stream. *Neotropical Ichthyology* **5**, 327-336.

Carlsson, C., Johansson, A., Alvan, B., Bergman, K., Kuhler, T. (2006). Are pharmaceuticals potent environmental pollutants? Part I: environmental risk assessments of selected active pharmaceutical ingredients. *Science Total Environmental* **364**, 67-87.

Carrola, J., Fontaínhas-Fernandes, A., Matos, P., Rocha, E. (2009). Liver Histopathology in Brown Trout (*Salmo trutta* f. fario) from the Tinhela River, Subjected

to Mine Drainage from the Abandoned Jales Mine (Portugal). *Bulletin of Environmental Contamination*. **83**, 35-41.

Cengiz, E., Ünlü, E. (2003). Histopathology of Gills in Mosquitofish, *Gambusia affinis* After Long-Term Exposure to Sublethal Concentrations of Malathion. *Journal of Environmental Science and Health*, **38**. 581-589.

Cengiz, E., Ünlü, E. (2006). Sublethal effects of commercial deltamethrin on the structure of the gill, liver and gut tissues of mosquitofish, *Gambusia affinis*: A microscopic study. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **21**. 246-253.

Cleuvers, M. (2003). Aquatic Ecotoxicology of Pharmaceuticals including the assesment of combination effects. *Toxicology Letters*. **142**, 185-194.

Costa, P., Diniz, M., Caeiro, S., Lobo, J., Martins, M., Ferreira, A., Caetano, M., Valec, C. DeIValls, A., Costa, M. (2009). Histological biomarkers in liver and gills of juvenile *Solea senegalensis* exposed to contaminated estuarine sediments: A weighted indices approach. *Aquatic Toxicology*. **92**, 202-212.

Coutinho, C., Gokhale, K.S. (2000). Selected oxidative enzymes and histopathological changes in the gills of *Cyprinus carpio* and *Oreochromis mossambicus* cultured in secondary sewage effluent. *Water Research*. **34**, 2997-3004.

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

Dautremepuits, C., Marcogliese, D., Gendron, A., Fournier, M. (2009). Gill and head kidney antioxidant processes and innate immune system responses of yellow perch (*Perca flavescens*) exposed to different contaminants in the St. Lawrence River, Canada. *Science of the Total Rnvironment* . **407**, 1055 -1064.

Davies, A. (1995). Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochemical Society Symposium*. **61**, 1-31.

Dorval, J., Hontela, A. (2003). Role of glutathione redox cycle and catalase on defense against oxidative stress induced by endosulfan in adrenocortical cells os rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Toxicology and Applied Pharmacology*. **192**, 191-200.

Falkner, C., Clark, G. (1992). Glutathione S-transferase from an Antarctic fish, *Dissostichus mawsoni*. *Marine Environmental Research*. **34**, 243-247.

Fent, K., Weston, A., Caminada, D. (2006). Ecotoxicology of Human Pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology*. **76**, 122-159.

Fernandes, C., Fontainhas-Fernandes, A., Monteiro, S., Salgado, M. (2007). Changes in the plasma electrolytes and Gill Histopathology in Wild *Liza saliens* from the Esmoriz-Paramos Coastal Lagoon, Portugal. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. **79**, 301-305.

Fernandes, C., Fontainhas-Fernandes, A., Ferreira, M., Salgado, M. (2008). Oxidative stress response in gill and liver of *Liza saliens* from the Esmoriz-Paramos Coastal Lagoon, Portugal. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. **55**, 262-269.

Ferreira, G., Simas, T., Nobre, A., Silva, C., Shifferegg, K., Lencart-Silva, J. (2003). Identification of sensitive areas and vulnerable zones in transitional and coastal Portuguese systems - Application of the United States National estuarine.

Fick, J., Lindberg, H., Tysklind, M., Larsson, J. (2010). Predicted critical environmental concentrations for 500 pharmaceuticals. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. **58**, 516-523.

Figueiredo-Fernandes, A., Fontainhas-Fernandes, A., Monteiro, R., Reis-Henriques, M., Rocha, E. (2006). Effects of the Fungicide Mancozeb on Liver Structure of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*: Assessment and Quantification of Induced Cytological Changes Using Qualitative Histopathology and the Stereological Point-Sampled Intercept Method. *Bulletin of Environmental Contamination*. **76**, 249-255.

Gallagher, P., Canada, T., Di Giulio, T. (1992). The protective role of glutathione in chlorothalonil-induced toxicity to channel catfish. *Aquatic Toxicology*. **23**, 155-168.

Giari, L., Manera, M., Simoni, D. (2007). Cellular alterations in different organs of European *Dicentrarchus labrax* (L.) exposed to cadmium. *Chemosphere*. **67**, 1171-1181.

Graham, R.S., Sloman, K.A. (2004). The effects of environmental pollutants on complex fish behavior: integrating behavioral and physiological indicators of toxicology. *Aquatic Toxicology*. **68**, 369-392.

Guimarães, S., Moura, D., Silva, P. (2006). *Terapêutica Medicamentosa e Suas Bases Farmacológicas*. Porto, Porto Editora.

Gül, Ş., Belge-Kurutaş, E., Yıldız, E., Şahan, A., Doran, F. (2004). Pollution correlated modifications of liver antioxidant systems and histopathology of fish (*Cyprinidae*) living in Seyhan Dam Lake, Turkey. *Environment International*. **30**, 605-609.

Gulick, A., Fahl, W. (1995). Forced evolution of glutathione S-transferase to create a more efficient drug detoxication enzyme. *Pharmacology*. **92**, 8140-8144.

Habig, H., Pabst, J., Jakoby, B. (1974). Glutathione S-Transferases - First Enzymatic Step on Mercapturic Acid Formation. *Journal of Biological Chemistry*. **249**, 7130-7139.

Halling-Sørensen, S., Nors Nielsen, S., Lanzky, F., Ingerslev, F., Holten Lutzhoft, C., Jørgensen, E. (1998). Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment – a review. *Chemosphere*. **36**, 357-393.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (1989). *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3^a edição. Oxford. Oxford University Press. pp. 936.

Handy, D., Runnals, T., Russel, M. (2002). Histopathologic biomarkers in three spined sticklebacks, *Gasterosteus aculeatus*, from several rivers in southern England that meet the freshwater fisheries directive. *Ecotoxicology*. **11**, 467-479.

Hayes, J., Flanagan, J., Jowsey, I. (2005). Glutathione Transferases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. **45**, 51-88.

Heberer, T. (2002). Occurrence, fate and removal of pharmaceutical residues on the aquatic environment; a review of recent research data. *Toxicology Letters*. **131**, 5-17.

Henschel, K.P., Wenzel, A., Diedrich, M., Fliedner, A. (1997). Environmental Hazard assesment of Pharmaceuticals. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. **25**, 220-225.

Hinton, E., Baumann, P., Gardner, G., Hawkins, W., Hendricks, J., Murchelano, R., Okihiro, M. (1992). Histopathologic biomarkers. In: Hugett, R., Kimerle, R., Mehrle, P., Bergmann, H. (Eds.), *Biomarkers, Biochemical, Physiological, and Histological Markers of Anthropogenic Stress*. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, pp. 155-210.

Hinton, E. (1994). Architectural pattern, tissue and cellular morphology in livers of fish: relationship to experimentally-induced neoplastic responses. *Fish Ecotoxicology*. Birkhauser Verlag. 141-164.

Infarmed. (2009). Medicines Statistic. pp. 1-94 [Em linha]. Disponível em <http://www.infarmed.pt/portal/page/portal/infarmed/publicacoes/tematicos/estatistica_medicamento/EstMed-2009.pdf> [Consultado em 22/08/2011].

Jagoe, C., Faivre, A., Newman, M. (1996). Morphological and morphometric changes in the gills of mosquito fish (*Gambusia holbrooki*) after exposure to mercury. *Aquatic Toxicology*. **34**, 163-183.

Jemec, A., Drobne, D., Tibler, T. (2009). Biochemical biomarkers in environmental studies - Lessons learnt from enzymes Catalase, Glutathione S-Transferases and Cholinesterase in two crustacean species. *Environment Science Pollution*. **12**, 111-123.

Jones, O.A.H., Voulvoulis, N., Lester, J.N. (2002). Aquatic environmental assessment of the top 25 English prescription pharmaceuticals. *Water Research*. **36**, 5013-5022.

Joint Center for Structural Genomics Home Page [Em linha]. Disponível em http://www.jcsg.org/images/stim/3cbu-YP_295234.1.html. [Consultado em 22/08/2011].

Kümmerer, K. (2001). Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to the other sources - a review. *Chemosphere*. **45**, 957-969.

Lang, T., Wosniok, W., Barsiene, J., Broeg, K., Kopecka, J., Parkkonen, J. (2006). Liver histopathology in Baltic flounder (*Platichthys flesus*) as indicator of biological effects of contaminants. *Marine Pollution Bulletin*. **53**, 488-496.

Laurent, P., Hobe, H., Dunel-Erb, S. (1985). The role of environmental sodium chloride relative to calcium in gill morphology of freshwater salmonid fish. *Cell and Tissue Research*. **240**, 675-692.

Liao, Y., Fu, J., Shi, B., Zhou, F., Yaun, C., Jiang, G. (2006). Methylmercury accumulation, histopathology effects, and cholinesterase activity alterations in medaka (*Oryzias latipes*) following sublethal exposure to methylmercury chloride. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. **22**, 225-233.

Livingstone, R. (1991). Organic xenobiotic metabolism in marine invertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology*. **7**, 5-185.

Leonardo, J., Vargas, L., Ribeiro, R., Moreira, H., Natali, M., Cavichiolo, F. (2001). Histologia das brânquias de larvas da tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* (L.), de origem tailandesa, submetidas a diferentes níveis de vitamina C. *Acta Scientiarum* **23**, 863-870.

Mallatt, J. (1985). Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical review. *Canadian Journal of Fish and Aquatic Sciences*. **42**, 630-648.

Martinez-Lara, E., Toribio, F., López-Barea, J., Bárcena, J. (1996). Glutathione-S-transferase isoenzyme patterns in the gilthead seabream (*Sparus aurata*) exposed to environmental contaminants. *Comparative Biochemistry and Physiology*. **113**, 215-220.

McCarthy, F., Halbrook, R., Shugart, R. (1991). Conceptual strategy for design, implementation, and validation of a biomarker based biomonitoring capability. *Environmental Sciences Division*, Oak Ridge National Laboratory, Tennessee, USA.

Melo, C., Fanta, S. (2004). Efeitos subletais da acção do organofosforado Folidol 600 no fígado do peixe de água doce jundiá *Rhamdia quelen* (Quoy e Gaimard, 1824) : uma análise histopatológica. Universidade federal do Panamá, sector de ciências biológicas. Programa de pós-graduação em biologia celular e molecular.

Morgan, J., Sturzenbaum, S., Kille, P. (1999). A short overview of molecular biomarker strategies with particular regard to recent developments in earthworms. *Pedobiologia* **43**, 574-584.

Ngugi, A.K., Kariuki, S.M., Bottomley, C. (2011). Incidence of epilepsy: A systematic review and meta-analysis. *Neurology*. **77**, 1005-1012.

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*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. **61**, 413-419.

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

Nunes, B. (2006). Pharmaceutical Drugs on the Environment: Change in the Paradigm. *Revista da Universidade Fernando Pessoa*. **3**, 92-103.

Nunes, B., Gaio, A., Carvalho, F., Guilhermino, L. (2008). Behaviour and biomarkers of oxidative stress in *Gambusia holbrooki* after acute exposure to widely used pharmaceuticals and a detergent. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 71, 341-354.

OECD, 1993. OECD Guidelines for the testing of chemicals. Test 203: Fish, Acute Toxicity Test.

OECD. (1984b) Test no. 203: Fish, Acute Toxicity Test. *OECD Guidelines Testing Chem.* 1, 1-9.

Olurin, K., Olojo, E., Mbaka, G., Akindele, A. (2006). Histopathological responses of the gill and liver tissues of *Clarias gariepinus* fingerlings to the herbicide, glyphosate. *African Journal of Biotechnology*. 5, 2480-2487.

Pacheco, M., Santos, M. (2002). Biotransformation, genotoxic and histopathological effects of environmental contaminants in European eel (*Anguilla anguilla* L.). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 53, 331-347.

Peakall, D., W. (1992). Animal biomarkers as pollution indicators. Chapman & Hall, London.

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

Preston, B. (2002). Indirect effects in aquatic ecotoxicology: Implications for ecological risk assessment. *Environmental Management*. 29, 331-323.

Regoli, F., Gorbi, S., Frenzilli, G., Nigro, M., Corsi, I., Focardi, S., Winston, G. (2002). Oxidative Stress in ecotoxicology: from the analysis of individual antioxidants to a more integrated approach. *Marine Environmental Research*. 54, 419-423.

Réndon-von Osten, J., Ortiz-Arana, A., Guilhermino, L., Soares, A. (2005). In vivo evaluation of three biomarkers in the mosquitofish (*Gambusia yucatana*) exposed to pesticides. *Chemosphere*. 58, 627-636.

Richmonds, C., Dutta, H. (1989). Histopathological changes induced by malathion in the gills of bluegill *Lepomis macrochirus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. **43**, 123–130.

Santos, L., Araújo, A., Fachinia, A., Penab, A., Delerue-Matos, C., Montenegro, A. (2010). Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *Journal of Hazardous Materials*. **175**,45–95.

Scandalios, J. (2005). Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. **38**, 995-1014.

Suarez, S., Carballa, M., Omil, F., Lema, J. (2008). How are pharmaceutical and personal care products (PPCPs) removed from urban wastewaters? *Environmental Science Biotechnology*. **7**, 125-138.

Ternes, T. (1998). Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water Reseach*. **32**, 3245-3260.

Timbrell, A. (1998). Biomarkers in toxicology. *Toxicology*. **129**, 1-12.

Truhaut, R. (1977). Ecotoxicology: Objectives, principles and perspectives. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. **1**, 151-173.

van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. **13**, 57-149.

Veronese, M., Doecke, C., Mackenzie, P., McManus, M., Miners, J., Rees, D., Gasser, R., Meyer, U., Birkett, D. (1991). Tolbutamide and phenytoin hydroxylations by cDNA-expressed human liver cytochrome P4502C9. *Biochemical and Biophysical Research Community*. **175**, 1112-1118.

Veronese, M., Doecke, C., Mackenzie, P., McManus, M., Miners, J., Rees, D., Gasser, R., Meyer, U., Birkett, D. (1993). Site-directed mutation studies of human liver cytochrome P-450 isoenzymes in the CYP2C subfamily. *Biochemistry Journal*. **289**, 533-538.

Walker, C., Hopkin, S., Sibly, R., Peakall, D. (2001). *Principles of ecotoxicology*. Taylor and Francis. Second edition. New York. Chapter 2, 3, 6, 7, 10.

Yu, J., Bouwer, E., Coelhan, M. (2006). Occurrence and biodegradability studies of selected pharmaceuticals and personal care products in sewage effluent. *Agricultural Water Management*. **86**, 72-80.

Zha, J., Wang, N., Ingersoll, C. (2007). Histological alternation and vitellogenin induction in adult rare minnow (*Gobiocypris rarus*) after exposure to ethynylestradiol and nonylphenol. *Chemosphere*. **66**, 488-495.

Zhou, Q., Zhang J., Fu, J., Shi, J., Jiang, G. (2008). Biomonitoring: An appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. *Analytica Chimica Acta*. **606**, 135-150.

Zuccato, E., Calamari, D., Natangelo, M., Fanelli, R. (2000). Presence of therapeutic drugs in the environment. *Lancet*. **355**, 1789-1790.