

Lia Azeredo Moreira Nogueira

**ANÁLISE DOS EFEITOS DE FÁRMACOS NO MEIO AMBIENTE
AQUÁTICO – USO DE BIOMARCADORES**

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade Ciências da Saúde

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Porto, 2013

Lia Azeredo Moreira Nogueira

**ANÁLISE DOS EFEITOS DE FÁRMACOS NO MEIO AMBIENTE
AQUÁTICO – USO DE BIOMARCADORES**

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade Ciências da Saúde

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Porto, 2013

Lia Azeredo Moreira Nogueira

**ANÁLISE DOS EFEITOS DE FÁRMACOS NO MEIO AMBIENTE
AQUÁTICO – USO DE BIOMARCADORES**

Declaro que o presente trabalho foi realizado na Íntegra por mim e que todo o material bibliográfico necessário foi consultado e se encontra devidamente referenciado.

A aluna:

(Lia Azeredo Moreira Nogueira)

Projeto de Pós-Graduação/Dissertação apresentada à
Universidade Fernando Pessoa, como parte dos requisitos
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências
Farmacêuticas, sob orientação do Professor Doutor
Alberto Correia.

Porto, 2013

RESUMO

A ocorrência de fármacos no meio ambiente aquático é um assunto de atual e particular interesse para a comunidade científica. Diversos compostos de cariz farmacológico têm sido detetados em efluentes de estações de tratamento de águas residuais e conseqüentemente no compartimento aquático por todo o mundo. Alguns dos efeitos adversos causados por fármacos no compartimento aquático incluem toxicidade, desenvolvimento de resistência em bactérias patogénicas, genotoxicidade e desregulação endócrina. Num contexto de análise do risco ambiental, a utilização de diversos biomarcadores promete ser um indicador sensível que demonstra que o composto tóxico entrou no organismo, começou a ser distribuído nos tecidos/órgãos e está a começar a produzir efeitos tóxicos críticos. O objetivo deste trabalho foi identificar as conseqüências ambientais, e eventualmente de saúde pública, que resultam da contaminação do compartimento aquático por via de compostos farmacológicos inapropriadamente libertados para o meio aquático, ou lixiviados nos esgotos domésticos como metabólitos secundários humanos, bem como referenciar formas de detetar os efeitos causados nos seres vivos fruto da exposição a estes compostos antrópicos. Particular ênfase foi dada a utilização dos biomarcadores enquanto ferramenta de análise ecotoxicológica.

Palavras-chave: Compartimento aquático, biomarcadores, ecotoxicologia, xenobióticos, poluição.

ABSTRACT

The occurrence of pharmaceuticals in the aquatic environment is a subject of current and particular interest to the scientific community. Several pharmacological compounds have been detected in wastewater treatment stations for wastewater and consequently in the aquatic compartment worldwide. Some of the adverse effects caused by these chemicals in the aquatic compartment include toxicity, development of resistance in pathogenic bacteria, genotoxicity and endocrine disruption. In the context of environmental risk analysis, the use of various biomarkers promises could be a sensitive indicator which shows that the toxic compound after entering the organism, and being distributed in tissues/organs, is starting to produce critical toxic effects. The aim of this study was to identify the environmental problems and public health issues, that result from contamination of the aquatic compartment via the direct release of pharmacological compounds into the water, or through human secondary metabolites in usually found in wastewater. Particular emphasis was given to the use of biomarkers as ecotoxicological analysis tools.

Keywords: Aquatic Compartment, biomarkers, ecotoxicology, xenobiotics, pollution.

AGRADECIMENTOS

Neste percurso de quase cinco anos é inevitável que muitas pessoas tenham cruzado a minha vida, pessoas essas, a quem devo os meus sinceros agradecimentos:

Ao meu orientador, Prof. Doutor Alberto Correia, por toda a disponibilidade e apoio prestado durante o decorrer deste trabalho.

À instituição Universidade Fernando Pessoa, por me ter acolhido nesta fase de progressão da minha carreira profissional.

À Farmácia de Recarei, na pessoa da Dra. Helena Andrade e aos meus colegas (Anabela, Cláudia, Diogo, Fátima e Paula) que me deram toda a força para que este projeto fosse concretizado.

Obrigada à minha Família, que sempre me incentivou a avançar com este projeto. Agradeço o apoio que nunca faltou mesmo quando o estudo me roubava tempo em família. Desculpem o mau humor e o desespero que às vezes tomavam conta de mim.

Ao Pedro, agradeço a paciência, ajuda e a tua incondicional disponibilidade! És o significado de Companheiro!

E finalmente aos meus Pais, por tudo o que me têm proporcionado ao longo da desta vida! Obrigada por me ensinarem que a Educação, o Conhecimento, o Trabalho e a Solidariedade são as alavancas para um mundo melhor!

“Se podes olhar, vê. Se podes ver, repara.”

José Saramago

ÍNDICE GERAL

I	INTRODUÇÃO À PROBLEMÁTICA DOS EFEITOS DE FÁRMACOS NO AMBIENTE AQUÁTICO	1
II	FÁRMACOS COMO CONTAMINANTES AMBIENTAIS	5
1.	Estações de Tratamento de Águas Residuais – remoção de fármacos e seus resíduos	8
2.	Classes de fármacos no ambiente.....	9
III	BIOMARCADORES	13
1	Classificação	13
2	Aplicação dos biomarcadores.....	15
2.1	Biomarcadores de Stress Oxidativo	17
2.2	Biomarcadores Histopatológicos.....	20
2.3	Biomarcadores Genotóxicos	21
2.4	Biomarcadores de Biotransformação	23
2.5	Biomarcadores de Neurotoxicidade	24
IV	CONSIDERAÇÕES FINAIS	25
V	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	26

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1- Representação das possíveis vias de introdução de fármacos no ambiente (Bound e Voulvoulis, 2005).....	7
Figura 2- Classes terapêuticas encontradas no ambiente, expressas em percentagem relativa (adaptado de Santos et al., 2009).....	11

ABREVIATURAS

AChE - acetilcolinesterase

ANE - anomalias nucleares eritrocíticas

CAT - catalase

DNA - ácido desoxirribonucleico

ETARs - Estações de Tratamento de Águas Residuais

GPx - glutathione peroxidase

GRed - glutathione reductase

GST - glutathione-S-transferase

HAPs - Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos

ROS - Espécies Reativas de Oxigénio

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio

SOD - superóxido dismutase

UE - União Europeia

I INTRODUÇÃO À PROBLEMÁTICA DOS EFEITOS DE FÁRMACOS NO AMBIENTE AQUÁTICO

Segundo o Decreto-Lei n.º 176/2006 de 30 de Agosto que define o “estatuto do medicamento”, por medicamento designa-se: “...*toda a substância ou associação de substâncias apresentada como possuindo propriedades curativas ou preventivas de doenças em seres humanos ou dos seus sintomas ou que possa ser utilizada ou administrada no ser humano com vista a estabelecer um diagnóstico médico ou, exercendo uma ação farmacológica, imunológica ou metabólica, a restaurar, corrigir ou modificar funções fisiológicas*”. Podemos afirmar que os medicamentos são na nossa sociedade um produto de consumo em grande escala, utilizados por qualquer classe etária e social. A imensa quantidade e diversidade de resíduos de medicamentos produzidos e libertados por toda a sociedade têm levado a que o meio ambiente, em particular o compartimento aquático, esteja exposto continuamente à sua presença (Daughton e Ternes, 1999; Jones et al., 2002; Miao et al., 2002).

Para obterem a autorização de introdução no mercado de qualquer medicamento, aos laboratórios fabricantes, é exigida a apresentação dos fundamentos que justifiquem medidas preventivas ou de segurança, respeitantes não só ao armazenamento e administração do medicamento mas também à eliminação dos seus resíduos. A eliminação incorreta de fármacos, bem como o facto de os seus metabolitos, resultantes da sua passagem pelo organismo humano, serem lançados nas redes de esgotos, tornaram-se um grave problema ambiental (Little et al., 1998).

A importância do impacte ambiental destes resíduos prende-se com o facto de a sua elaboração ser realizada com o intuito de obter efeitos biológicos em organismos alvo, o qual pode ser replicado a outros seres presentes no meio ambiente. Ao mesmo tempo, muitos destes medicamentos possuem propriedades que poderão potenciar a sua bioacumulação e persistência no meio terrestre e aquático devido sobretudo à sua capacidade de atravessar as membranas celulares fruto da sua lipofilia. Para além disso, estas moléculas são concebidas de forma a apresentar alguma resistência à degradação química e metabólica com o intuito de exercer um efeito antes da sua inativação (Celiz et al., 2009).

Após a administração, e após metabolização corporal, uma parte significativa dos fármacos é excretada pelos humanos, via urina ou fezes, acabando inevitavelmente no esgoto doméstico. Estudos demonstram que inúmeras dessas substâncias parecem ser persistentes no meio ambiente e não são completamente removidas nas estações de tratamento de águas residuais (ETARs) (Stumpf et al., 1999).

É consensual que para além dos fármacos originais devem ser estudados os metabolitos secundários gerados e os produtos de degradação ambiental (Nunes, 2007).

Face à intensa pesquisa realizada sobre esta matéria, pode afirmar-se que o uso de fármacos pode interferir diretamente com os ecossistemas, sobretudo nos aquáticos, uma vez que esse meio serve de destino final para a maioria dos resíduos humanos, incluindo os medicamentos (Nunes, 2007). Como consequência da complexidade desta possível contaminação ambiental, para se poder avaliar e encarar de uma forma eficaz a ecotoxicidade dos fármacos, deve-se atuar e controlar os seguintes parâmetros: 1) a quantidade de fármacos que são descartados para o meio aquático pela população; 2) inventariar os metabolitos que são encontrados nas águas residuais; 3) a quantidade de fármacos que é efetivamente degradada pelas ETARs; 4) o peso global dos fármacos que entram em contacto com ambiente aquático após deposição; 5) os efeitos biológicos em espécies não-alvo e em vários níveis tróficos; 6) a ocorrência de bioacumulação e/ou biomagnificação ao longo das cadeias alimentares; e 7) a interferência destes resíduos com o nosso organismo através da entrada por via dos alimentos e da água ingerida (Nunes, 2007).

Em 1969 foi elaborado o primeiro relatório sobre os efeitos de produtos farmacêuticos em organismos não-alvo (Montforts, 2008). Contudo só mais tarde, nomeadamente com a descoberta do etinilestradiol e dos efeitos dos estrogénios em peixes (Purdom et al., 1994; Vethaak et al., 2002) e o efeito letal do diclofenac sobre populações de abutres (Oaks et al., 2004), é que esta questão se tornou uma prioridade para a comunidade científica.

São descritos valores elevados de contaminação em diversos tipos de amostras, para várias classes de fármacos, o que pode, consequentemente, levar a efeitos agudos e crónicos sobre os organismos. É importante ainda salientar que alguns destes compostos, podem causar efeitos tóxicos sinérgicos quando na presença de outros (Clevers, 2003).

Em todo o mundo, fármacos, tais como antibióticos, hormonas, anestésicos, meios de contraste e anti-inflamatórios, entre outros, têm sido detetados nos esgotos domésticos não tratados, em águas superficiais e no subsolo (Sacher et al., 2000; Kolpin et al., 2002).

Conforme afirmado pelo Comissário Europeu John Dalli, responsável pela Saúde e Proteção dos Consumidores, no Fórum da Saúde 2010: “O investimento em investigação na área da contaminação das águas pelos medicamentos constitui um investimento que contribui para promover a saúde, o bem-estar e a prevenção de doenças, contribuindo para um ambiente e para o crescimento económico sustentável.”

Desta forma, na União Europeia (UE), a fim de minimizar o possível risco provocado pelos medicamentos, foram implementadas medidas regulamentares que comportam a avaliação do seu risco baseada numa abordagem preditiva do impacto no ambiente. Recentemente, a Diretiva 2001/83/CE, com a última redacção que lhe foi dada pela Diretiva 2004/27/CE (código comunitário relativo aos medicamentos para uso humano), exige uma avaliação do potencial risco ambiental para autorização de introdução no mercado de qualquer medicamento. No entanto, a falta de dados relevantes para cada medicamento dificulta a correta avaliação do seu risco ambiental.

O risco de um impacto ambiental adverso vai depender da extensão à qual o ambiente estará exposto a concentrações de uma ou mais substâncias. Além do facto da quantidade lançada no ambiente ser um fator fundamental, a bioacumulação e a persistência vão reforçar o grau de exposição (Bengtsson et al., 2006).

A exposição a contaminantes químicos, no caso particular dos peixes, é uma causa provável de indução de um número elevado de lesões em diferentes órgãos. Independentemente da via de entrada dos fármacos e seus derivados no meio ambiente, estes afetam a vida aquática. Foi reportado o desenvolvimento da resistência bacteriana aos antibióticos usados em hospitais, os quais são poderosos focos de desenvolvimento de resistência bacteriana (Bila et al., 2003). Foi descrita a resistência bacteriana, por exemplo, da espécie *Escherichia coli*, isolada de águas subterrâneas de uma região rural, relativamente a 16 antibióticos (Mckeen et al., 1995). De facto, na presença destes fármacos, os microorganismos podem ser diretamente inibidos, ou, desenvolver resistência aos mesmos, passando esta característica aos descendentes (Bengtsson et al., 2006). Os microorganismos mais resistentes podem causar desequilíbrios ecológicos,

crecendo a custa de outros, ou, sendo patogénicos ao homem, resistir ao tratamento a antibióticos aos quais antes eram sensíveis (Bengtsson et al., 2006).

É do conhecimento científico que os vertebrados aquáticos são altamente sensíveis à indução endócrina, nomeadamente através da exposição aos estrogénios (Crane et al., 2006). Os efeitos adversos dos estrogénios parecem não afetar apenas os peixes. A exposição aos estrogénios é também capaz de induzir efeitos adversos sobre os invertebrados ainda que em concentrações na ordem dos ng/L ou ainda menores (Crane et al., 2006). Os problemas mais referenciados são os efeitos na reprodução de várias espécies, principalmente causados por estrógenos (contraceptivos e terapia de reposição hormonal), como, por exemplo, o etinilestradiol (Sonnenschein et al., 1998).

A ivermectina, um antiparasitário de uso veterinário, é excretada nas fezes ainda na sua forma ativa, sendo assim capaz de afetar organismos não-alvo, tal como a *Daphnia magna*, um invertebrado de água doce (Carlsson et al., 2006).

Em regra, os fármacos destinados ao tratamento de patologias da tiroide não são removidos das águas residuais durante o seu tratamento nas ETARs e, desta forma, estão presentes em fontes de água superficiais para consumo (Brown, 2004).

II FÁRMACOS COMO CONTAMINANTES AMBIENTAIS

Uma das classes de xenobióticos que nos últimos anos se encontra em foco ao nível da toxicologia ambiental corresponde aos compostos farmacêuticos utilizados na medicina humana e veterinária, agricultura e aquacultura (Laville et al., 2004; Oggier et al., 2010).

Com a evolução tecnológica na indústria farmacêutica e os avanços na investigação de novos compostos terapêuticos, os fármacos passaram a exercer um papel fundamental no tratamento, prevenção e diagnóstico de inúmeras patologias (Melo et al., 2006).

As suas características intrínsecas, nomeadamente a sua lipofilia, são a principal razão pela qual estes compostos são considerados potencialmente perigosos para o ambiente e para a saúde pública (Fent et al., 2006). É ainda importante salientar que para além das características intrínsecas, os fármacos possuem outras que os transformam num obstáculo de preocupação crescente do ponto de vista ambiental e saúde pública: possuem atividade farmacológica marcada, apresentam resistência aos processos de metabolização, são suscetíveis de sofrer fenómenos de biomagnificação e bioacumulação, são ambientalmente ubíquos e são libertados em quantidades elevadas para o ambiente frequentemente sem qualquer tratamento prévio (Nunes et al., 2004)

Desta forma, quando os fármacos ou seus resíduos são libertados no ambiente podem produzir em animais, nomeadamente em peixes e anfíbios, efeitos equivalentes aos que são produzidos nos humanos, já que estes organismos têm mecanismos de metabolização semelhantes ou tecidos/órgãos similares (Fent et al., 2006; Fick et al., 2010).

O principal fator que conduz à contaminação ambiental pelos fármacos é a excreção urinária e fecal, após o seu consumo. A atividade agropecuária é também responsável pela entrada de compostos farmacêuticos no meio aquático, nomeadamente por via do uso de produtos veterinários em grandes quantidades, entre eles antibióticos e fatores de crescimento animal. A prática de aquacultura é também considerada uma fonte de poluição, um vez que utiliza anti-infecciosos e anestésicos que são lançados diretamente na água sem tratamento prévio (Daughton e Ternes, 1999).

Contudo, é importante considerar outros fatores tais como a eliminação de compostos de diagnóstico, descargas caseiras e descargas poluentes das indústrias farmacêuticas (Zucatto et al., 2000).

Grande parte dos resíduos domésticos, incluindo fármacos, tem como via de passagem as ETARs. Estas vêm, cada vez mais, apresentado um papel importante no tratamento e eliminação de resíduos químicos, incluindo também os fármacos.. Os afluentes de ETARs domésticas e industriais por norma são sujeitos a um conjunto de tratamentos. Contudo, vários estudos apontam para que ETARs não sejam capazes de remover completamente os produtos farmacêuticos (Santos et al., 2013). Num estudo realizado no Reino Unido sobre as 25 drogas mais usadas, os autores conseguiram prever que muitas das drogas estudadas não são passíveis de sofrer degradação considerável, nem tão pouco de ficar adsorvidas às lamas ativas resultantes dos processos de tratamento secundário. Tal facto significa que a concentração de algumas drogas, à saída da ETAR (nos efluentes após tratamento) pode ser entre 97 a 98% da quantidade à entrada, pelo que a esmagadora maioria das moléculas será diretamente descarregada inalterada para as águas de superfície (Jones et al., 2002).

Estudos revelaram a ocorrência e a eliminação de oito antibióticos selecionados, principalmente para uso humano, incluindo cloranfenicol, e antibióticos do grupo das fluoroquinolonas, sulfonamidas e macrólidos, em quatro ETARs no Delta do Rio das Pérolas, do Sul da China. As concentrações destes compostos em afluentes não tratados e efluentes finais nas quatro ETARs variaram, de 10 a 1978 ng/L e de 9 a 2054 ng/L, respetivamente. Verificou-se que os antibióticos não foram eliminados completamente nas 4 ETARs, com a maior eficiência de eliminação a não ultrapassar os 81% (Weihai et al., 2007).

Além dos efluentes domésticos e urbanos, os efluentes hospitalares são uma importante via de exposição ambiental de produtos farmacêuticos. Devido à sua natureza particular, espera-se que os efluentes hospitalares sejam uma mistura de compostos, incluindo não só os produtos farmacêuticos e seus metabolitos, mas também agentes de diagnóstico, desinfetantes, entre outros (Verlicchi et al., 2010).

O seguinte esquema representa as diferentes vias de introdução de fármacos no ambiente.

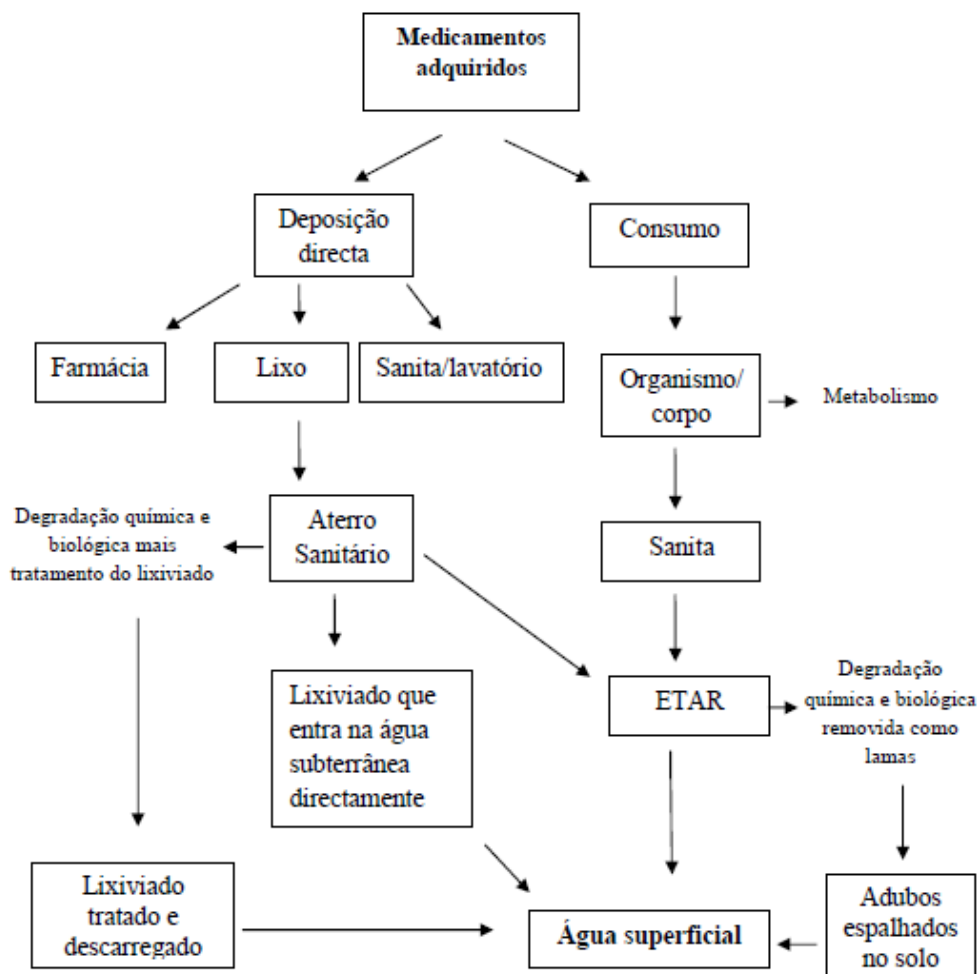


Figura 1- Representação das possíveis vias de introdução de fármacos no ambiente (Bound e Voulvoulis, 2005)

Em diversos estudos foi possível concluir que aproximadamente 500 produtos farmacêuticos, bem como inúmeros metabolitos foram detetados no ambiente aquático em vários países (Heberer, 2002; Fick et al., 2010). Estes dados são essenciais para que se consiga estabelecer quais as substâncias ativas mais relevantes para que sejam determinados os seus possíveis efeitos toxicológicos.

Sabe-se, hoje, que os fármacos podem ainda causar efeitos tóxicos sinérgicos quando na presença de outros compostos, dificultando os processos de avaliação de risco (Cleuvers, 2003).

Com os avanços das técnicas de detecção analítica, a partir de meados dos anos 90, o interesse na quantificação destes compostos no ambiente foi crescendo gradualmente (Fent et al., 2006). Estes compostos possuem uma maior ou menor atividade biológica

específica e podem ser classificados de acordo a sua função, atividade, estrutura química ou modo de ação (Kummerer, 2009).

1. Estações de Tratamento de Águas Residuais – remoção de fármacos e seus resíduos

No ambiente aquático, a ocorrência e destino dos compostos farmacologicamente ativos têm sido reconhecidos como um dos problemas emergentes nas sociedades desenvolvidas. Estudos desenvolvidos vários países, tais como Alemanha, Áustria, Brasil, Canadá, Croácia, Espanha, Grécia, Holanda, Inglaterra, Itália, Suíça e Estados Unidos da América, detetaram mais de 80 compostos, fármacos e seus metabolitos, no ambiente aquático (Heberer, 2002)

Grande parte dos resíduos, incluindo fármacos, têm como via de passagem as ETARs. Cada vez mais, as ETARs, apresentam um papel importante no seu tratamento e eliminação, de forma a minimizar o seu impacto no ambiente.

Os fármacos e seus resíduos vão estar mais ou menos presentes nas águas superficiais dependendo do tipo de tratamento instalado nas ETARs e da sua remoção. Contudo, os mecanismos de remoção não seguem um padrão, uma vez que a sua contribuição relativa depende das propriedades físico-químicas dos micropoluentes, da origem e composição da água residual, bem como de parâmetros operacionais do sistema de tratamento (Cirja et al., 2008),

A otimização dos processos das estações de tratamento de água residual é imprescindível para diminuir as quantidades de fármacos nos efluentes. Desta forma, tem-se aumentado os tempos de retenção nas lamas, e têm-se utilizado bioreatores de membrana e processos avançados de oxidação (Urase et al., 2005; Carballa et al., 2007; Sirés et al., 2007). Muitas das opções de tratamento tendem a reduzir os níveis de fármacos nos efluentes, mas não são amplamente utilizadas devido aos elevados custos associados (Dordio et al., 2009).

De uma forma geral, existem quatro tipos de tratamento de águas residuais, preliminar, primário, secundário e terciário. O tratamento preliminar é constituído por processos físicos, onde há remoção de sólidos grosseiros e também um sistema de

remoção de gorduras existentes na água residual (Cruz, 1997). O tratamento primário é constituído por processos físico-químicos. Nesta fase, procede-se ao pré-arejamento, equalização do caudal, neutralização da carga do efluente e posteriormente são usados processos tais como, floculação e sedimentação. O tratamento secundário é constituído por processos biológicos e físico-químicos. Os processos biológicos recorrem a mecanismos aeróbios que simulam o processo natural de degradação. Os processos anaeróbios consistem na estabilização de resíduos. Os processos físico-químicos são constituídos por sedimentadores secundários.

O tratamento terciário, ou desinfecção, é constituído apenas por processos físico-químicos. Nesta etapa procede-se à remoção de microrganismos patogénicos. A água resultante é sujeita a desinfecção através da adsorção com a utilização de carvão ativado e, se necessário, é realizado tratamento com cloro, ozono e ultravioletas (Cruz, 1997).

A eficiência de remoção das ETARs varia tanto de um grupo de substâncias para o outro, como de substância ativa para outra dentro do mesmo grupo fármaco-terapêutico (Schrapp et al., 2003). As taxas de remoção avaliadas em ETARs holandesas são, em média, inferiores a 25% para os antibióticos, entre 10 e 80% para os anti-epilépticos, beta-bloqueadores e agentes de redução lipídica, e superiores a 95% para os analgésicos (Schrapp et al., 2003; De Lange et al., 2006).

Mas em regra geral, a presença de fármacos no ambiente aquático demonstra a sua degradação e eliminação incompleta nas ETARs (Kummerer, 2009).

2. Classes de fármacos no ambiente

Por todo o mundo, existem diferenças no que diz respeito à prevalência de determinadas patologias, processos de tratamento de resíduos, hábitos culturais e restrições económicas relacionadas com o mercado farmacêutico (Zucatto et al., 2006).

Cerca de três mil substâncias diferentes, de uso humano, são usadas na União Europeia. Entre elas podemos salientar os analgésicos, anti-inflamatórios, contraceptivos, antibióticos, entre outras. Também um elevado número de fármacos é usado pela medicina veterinária, entre eles anti-inflamatórios e antibióticos (Fent et al., 2006).

Nas últimas décadas, a atenção dos investigadores focalizou-se nos temas relacionados com a exposição ambiental aos xenobióticos antropogénicos, assim como para a diversidade de efeitos que estes podem exercer nos sistemas biológicos (Nunes et al., 2004).

Os compostos farmacêuticos são geralmente detetados no meio ambiente numa gama que varia de ng/L a µg/L (Heberer, 2002), mas que pode ser suficiente para induzir efeitos tóxicos (Hernando et al., 2006).

Atualmente é assim possível destacar quais as classes terapêuticas mais relevantes na contaminação ambiental (Kummerer, 2001; Benotti et al., 2009). As classes farmacêuticas detetadas com maior frequência no ambiente são (ver figura 2): analgésicos e anti-inflamatórios, antibacterianos, bloqueadores-beta, reguladores de dislipidemias, 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).

Os substitutos hormonais, são substâncias exógenas que interferem na síntese, ação, transporte e eliminação de hormonas naturais responsáveis pela homeostasia corporal, em particular ao nível da reprodução, desenvolvimento e/ou comportamento, podendo até influenciar o funcionamento do sistema imunitário (Walker, 200; Bengtsson *et al*; 2006;).

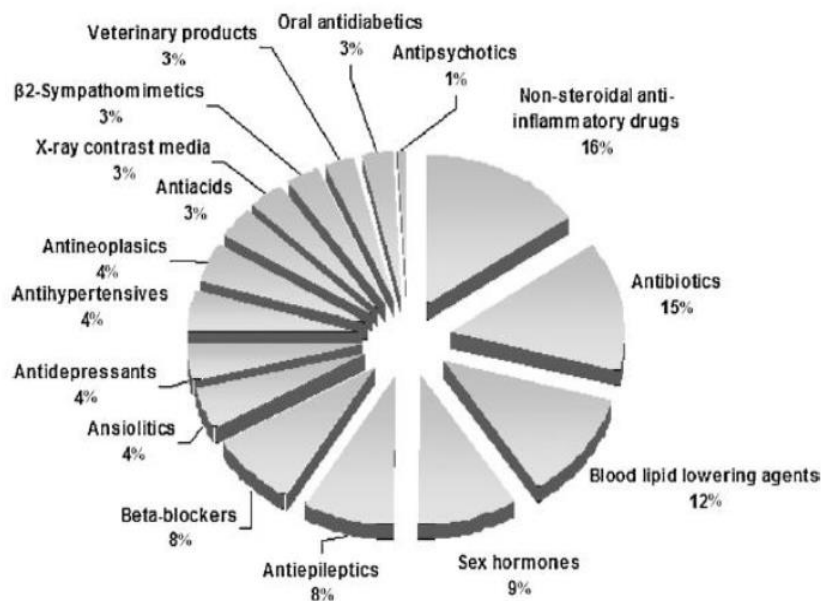


Figura 2- Classes terapêuticas encontradas no ambiente, expressas em percentagem relativa (adaptado de Santos et al., 2009)

Os problemas mais relatados são os efeitos na reprodução de várias espécies, principalmente causados por estrogénios (contraceptivos e terapia de reposição hormonal), como, por exemplo, o etinilestradiol (Sonnenschein *et al*, 1998). Alguns autores referenciam que, dependendo da dose e do tempo de exposição, é possível que essas substâncias estejam relacionadas com doenças, como cancro de mama, testicular e de próstata, ovários policísticos e redução da fertilidade masculina (Folmar et al., 2000).

A exposição do peixe zebra a 0,005 µg/L de etinilestradiol levou a um aumento do tempo de desenvolvimento embrionário. Já nos machos da truta arco-íris observou-se a indução da vitelogenina quando expostos a níveis na ordem dos 0,0001 µg/L. No mesmo estudo, foi ainda determinado que certas espécies de peixes no Reino Unido apresentavam características de intersexo a jusante das ETARs devido à exposição aos estrogénios (Carlsson et al., 2006).

Para peixes machos da espécie *Gambusia holbrooki* quando expostos ao diazepam, em teste agudo de 96 h, foram observadas mudanças no comportamento. Os animais apresentaram pigmentação escura e comportamentos anormais, como letargia e movimentação anómala (Nunes *et al.*, 2008).

Um estudo realizado em 1997, visou avaliar os efeitos toxicológicos da exposição *Oryzias latipes* a diclofenac. Este estudo revelou efeitos toxicológicos a nível celular e carcinogénicos nos tecidos desta espécie de peixe (Hong et al., 2007).

O ácido clofibrico, metabólito de antilipidémicos, foi identificado em rios, águas subterrâneas e água de consumo humano na Alemanha, em concentrações de µg/L (Buser et al., 1998; Zuccato *et al.*, 2000).

III BIOMARCADORES

A detecção precoce da exposição de um organismo a um xenobiótico pode diminuir de forma significativa a ocorrência de efeitos adversos na saúde. A implementação de medidas preventivas e de controlo apropriadas só será possível após a definição de níveis permissíveis de exposição. Estes níveis devem ser estabelecidos para que não sejam provocados efeitos adversos decorrentes da exposição.

Diversos são os parâmetros biológicos que podem estar alterados como consequência da interação entre o agente químico e o organismo. No entanto, a determinação quantitativa destes parâmetros usados como Biomarcadores, só é possível se existir correlação com a intensidade da exposição e/ou o efeito biológico da substância. Desta forma, o biomarcador inclui todas as substâncias ou seus produtos de biotransformação, assim como qualquer alteração bioquímica precoce, cuja determinação nos fluidos biológicos, tecidos ou ar exalado, avalie a intensidade da exposição e o risco para a saúde (WHO, 2006)

1 Classificação

A entrada cada vez maior de contaminantes para os ecossistemas aquáticos tem originado a necessidade de compreender e avaliar os efeitos biológicos dos poluentes sobre o meio aquático e comunidades aí residentes. Nesse sentido, um grande número de estudos tem utilizado biomarcadores como ferramentas funcionais para avaliar a toxicidade de tais compostos para as populações naturais (van der Oost et al., 2003; Rodrigues et al., 2011). Os biomarcadores podem ser classificados em três tipos, independentemente da sua finalidade e aplicação: biomarcadores de exposição, de efeito e suscetibilidade (IPCS, 1993; Timbrell, 1998; National Research Council, 2003; van der Oost et al., 2003).

- Biomarcadores de exposição: são aqueles que detetam e medem a quantidade de uma substância exógena, seus metabólitos ou o produto da

interação entre o xenobiótico e a molécula ou célula alvo em um compartimento do organismo;

- Biomarcadores de efeito: são aqueles que incluem alterações bioquímicas, fisiológicas ou outra alteração nos tecidos ou fluidos corporais de um organismo que podem ser reconhecidos e associados com uma doença ou possível prejuízo a saúde;
- Biomarcadores de suscetibilidade: são aqueles que indicam a habilidade adquirida ou inerente de um organismo a responder a exposição a um xenobiótico específico, incluindo fatores genéticos e mudanças nos receptores que alteram a suscetibilidade de um organismo a uma dada exposição.

Os biomarcadores de exposição podem ser usados para confirmar ou estimar a exposição de indivíduos ou de uma população a uma determinada substância ou grupo de substâncias fornecendo uma relação entre a exposição externa e a dose interna. De acordo com a definição, a bioacumulação de certos contaminantes persistentes em tecido de animais pode ser considerada com um biomarcador de exposição. Os biomarcadores de efeito podem ser usados para documentar alterações pré-clínicas ou efeitos adversos a saúde devido a exposição externa e absorção de determinada substância. Os biomarcadores de suscetibilidade ajudam a elucidar a variação no grau de resposta da exposição a substâncias tóxicas observadas em diferentes indivíduos. A associação entre os biomarcadores de exposição e efeito contribuiu para a definição da relação dose-resposta (Azevedo e Chasin, 2004). Os biomarcadores de susceptibilidade por sua vez, ajudam a elucidar o grau de resposta da exposição apresentada entre diferentes indivíduos (van der Oost et al., 2003).

Alem desta classificação, existem outras distintas, nomeadamente uma que adota uma perspectiva fisiológica. São considerados então os biomarcadores de neurotoxicidade (por exemplo o estudo da atividade da enzima acetilcolinesterase), biomarcadores de imunotoxicidade (por exemplo avaliando a concentração de imunoglobulinas), biomarcadores de stress oxidativo (por exemplo o estudo da actividade da enzima superóxido dismutase), biomarcadores histopatológicos (por exemplo, observando danos tecidulares), biomarcadores que avaliam a disrupção endócrina (por exemplo, avaliando níveis hormonais), entre outros (Peakall, 1992).

Os biomarcadores podem ser utilizados em três abordagens:

- 1) biomonitorização passiva, ou seja, comparando a resposta do biomarcador de locais contaminados e referência;
- 2) biomonitorização activa, com o transplante de espécies sentinelas para o local de estudo num período determinado, a fim de induzir as respostas dos biomarcadores;
- 3) ensaios de laboratório, onde as espécies são expostas a contaminantes sob condições controladas.

As abordagens 1 e 2 são geralmente utilizadas para a avaliação ambiental, enquanto a abordagem 3 é utilizada para investigar relações de causa-efeito (Losso e Ghirardini, 2009).

2 Aplicação dos biomarcadores

Os biomarcadores podem ser usados para vários propósitos, dependendo da finalidade do estudo e do tipo da exposição. Podem ter como objetivos avaliar a exposição (quantidade absorvida ou dose interna), avaliar os efeitos das substâncias químicas e avaliar a suscetibilidade individual. Além disso, podem ser utilizados independentemente da fonte de exposição, seja através da dieta, do meio ambiente geral ou ocupacional. A utilização destes biomarcadores pode ter como finalidade elucidar a relação causa-efeito e dose-efeito na avaliação de risco para a saúde; para fins de diagnóstico clínico; e para fins de monitorização biológica, realizada de maneira sistemática e periódica (van der Oost et al., 2003). Uma das razões mais fortes para a utilização de biomarcadores é o facto de que a informação obtida a partir deles refere-se aos efeitos biológicos de poluentes, ao invés de uma mera quantificação dos seus níveis ambientais (Peakall, 1994). A análise de múltiplos biomarcadores permitirá, em teoria, obter informações relativamente aos mecanismos de toxicidade dos xenobióticos e às suas consequências, locais alvo preferenciais e mecanismos de destoxificação e adaptativos (van der Oost et al., 2003).

O uso dos biomarcadores na avaliação de risco fornece uma ligação crítica entre a exposição à substância química, dose interna e dano para a saúde. Contudo, existe uma necessidade de identificar e validar para cada sistema orgânico estes parâmetros característicos que são indicativos de indução de disfunção orgânica, alteração clínica e

toxicidade patológica, além de estabelecer a especificidade e sensibilidade de cada biomarcador e seu método para determinação (van der Oost et al., 2003).

A utilização de biomarcadores de poluição ambiental baseia-se no facto da exposição a agentes tóxicos levar inicialmente a uma alteração ou perturbação de uma reação química, num determinado organismo. O facto de estas alterações conseguirem ser detetadas precocemente permite a identificação do problema antes que o compartimento ambiental seja completamente afetado. Desta forma podemos dizer que os biomarcadores são considerados como um “sinal de alerta” na avaliação da saúde ambiental (Peakall, 1994).

Um biomarcador ideal deve indicar a existência de potenciais efeitos adversos, de uma forma sensível e reprodutível, na fase inicial da ação toxicológica, preferencialmente antes do início da doença, infeção ou dano de tecidos, deve apresentar grande suscetibilidade, boa sensibilidade, relativa especificidade e baixo custo de análise. A utilização de biomarcadores permite a realização de estudos in vivo e in vitro. Os estudos in vitro representam uma ferramenta útil na triagem de diversos agentes poluentes e têm sido usados em áreas de monitorização e como método de análise quantitativa e qualitativa de poluentes orgânicos e metais pesados. Demonstram ser vantajosos pois permitem uma redução do tempo de análise, requerem menos esforço humano e são mais económicos. Os estudos in vivo tem sido realizados por via da exposição de organismos a concentrações conhecidas de poluentes, para a avaliação de risco. Desta forma, os dados dose-resposta obtidos permitem o estabelecimento de níveis aceitáveis de concentração no compartimento avaliado (WHO, 1996; Rüdiger, 1999)

Os biomarcadores ao demonstrarem os efeitos e suas causas, são ferramentas úteis para alcançar os objetivos das políticas referentes à saúde ambiental.

Recentemente, o acompanhamento dos efeitos biológicos tornou-se um componente essencial em programas de monitorização ambiental. Ao longo do tempo, os biomarcadores foram desenvolvidos e reconhecidos como sendo eficazes em fornecer um aviso prévio de efeitos prejudiciais sobre sistemas biológicos (Paul, 2003).

Os biomarcadores podem ser utilizados para diversas finalidades, dependendo do objetivo do estudo, da interação da substância química com os recetores biológicos e do tipo de exposição (Heberer,2002). Uma situação de “stress” químico causada por

poluentes por norma desencadeia uma cascata de respostas biológicas, onde cada uma dessas pode, em teoria, servir como biomarcador (McCarthy et al., 1991).

O uso de biomarcadores tem demonstrado ser muito vantajoso, sendo de salientar o seu custo relativamente baixo, simplicidade de procedimentos associados, aplicabilidade sob as mais variadas condições de teste e ainda sensibilidade para um elevado número de contaminantes ambientais. Estes, são capazes de nos fornecer informação sobre os efeitos biológicos dos contaminantes para além de uma mera quantificação dos seus níveis ambientais. Desta forma é possível quantificar e tipificar os seus efeitos mesmo estando presentes em concentrações vestigiais (Timbrell, 1998).

A seleção de um biomarcador adequado a um determinado estudo ecotoxicológico deve ter em conta os objetivos da biomonitorização. Os principais aspetos a ter em conta na sua escolha são, as características do organismo, as condições ambientais em teste, a resposta esperada, o tóxico a analisar, a via de exposição e a duração da exposição (Nunes et al., 2008).

É muito comum a utilização de invertebrados na monitorização ambiental por serem componentes maioritários dos ecossistemas e apresentarem abundância populacional (Péqueux, 1995). No entanto, é crescente o número de trabalhos onde peixes são usados como biomarcadores da qualidade dos ecossistemas aquáticos (e.g Pacheco e Santos, 2002; Thophon et al., 2003; Barcarolli e Martinez, 2004).

Os peixes ocupam diversos ambientes aquáticos e apresentam grande importância comercial, uma vez que fazem parte da dieta alimentar em muitos países e, em vários outros, são a principal fonte de proteínas da população (Silva et al., 2000). Vários estudos utilizam estes animais para avaliar o efeito do stresse causado por variações no ambiente aquático (Teh et al., 1997; Gundersen et al., 2000; Schwaiger, 2001).

2.1 Biomarcadores de Stress Oxidativo

A descoberta da presença de radicais livres nos sistemas biológicos foi de imediato associada a várias patologias e ao envelhecimento precoce. Estudos posteriores

revelaram que os efeitos prejudiciais dos radicais livres poderiam ser controlados através do recurso a agentes antioxidantes (Livingstone, 1991).

Inúmeros estudos revelaram que a exposição a contaminantes em ecossistemas aquáticos pode ser responsável pela produção intracelular de espécies reativas de oxigénio, as quais poderão conduzir a uma situação de stresse oxidativo nos sistemas biológicos (Livingstone, 1991). O stresse oxidativo é considerado uma perturbação no equilíbrio entre espécies redutoras e oxidantes que pode levar a efeitos prejudiciais a nível bioquímico e fisiológico (Halliwell e Gutteridge, 1989).

O stresse oxidativo é causado pela formação de espécies reativas de oxigénio (ROS), como por exemplo, o peróxido de hidrogénio (H_2O_2), o radical hidroxilo (HO^\cdot) e o radical anião superóxido (O^{2-}), principalmente como subprodutos do metabolismo oxidativo (Zhang et al., 2003; Bagnyukova et al., 2005; Lushchak, 2011).

As ROS podem atacar vários constituintes celulares, incluindo proteínas, ácidos nucleicos e lípidos, levando à alteração da função e integridade celular (Limón-Pacheco e Gonsebatt, 2009; Li et al., 2010a). De forma a reverter o dano oxidativo, os organismos evoluíram no sentido de serem dotados de múltiplos sistemas de defesa antioxidantes. Os antioxidantes endógenos enzimáticos e não enzimáticos são essenciais para a conversão de ROS em substâncias inofensivas e para a manutenção do metabolismo e função celular (Li et al., 2011; Lushchak, 2011).

Um dos principais danos induzidos pelas ROS são alterações de macromoléculas nas células, nomeadamente nas membranas lipídicas, ácido desoxirribonucleico (DNA) e proteínas. Estes danos podem revelar alterações do funcionamento celular, podendo eventualmente levar à morte celular (Davies, 1995).

Para avaliação dos parâmetros de stresse oxidativo é comum recorrer ao estudo de actividade de algumas enzimas, nomeadamente a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione redutase (GRed), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione-S-transferase (GST) (Regoli et al., 2002). As enzimas antioxidantes facilitam a remoção das ROS. A superóxido dismutase é capaz de metabolizar os aniões superóxido (O^{2-}) em peróxido de hidrogénio (H_2O_2). Por sua vez, essas moléculas de peróxido de hidrogénio podem ser reduzidas a água (H_2O) e oxigénio (O_2) pela catalase. Os radicais hidroxilo (OH^\cdot) podem ser formados a partir do H_2O_2 e O_2 por reações com os iões metálicos do ciclo redox, como por exemplo o ferro e o cobre. Este radical é altamente potente e pode

atacar proteínas e lípidos, formando os produtos resultantes dos danos oxidativos. A glutathione peroxidase pode reduzir os peróxidos lipídicos aos seus respectivos álcoois e água (Dinkova-Kostova, 2000).

Apesar da existência dos mecanismos fisiológicos de controlo de ROS (acima mencionados), é natural que por vezes ocorreram danos oxidativos, devido à produção extensiva ou reduzida capacidade de proteção do organismo (Nunes et al., 2006).

Em resposta ao stresse oxidativo, como já referido anteriormente, pode haver respostas adaptativas dos sistemas de defesa (antioxidantes), modificação de macromoléculas celulares e, finalmente, dano tecidular. As alterações nos sistemas oxidativos e as macromoléculas modificadas podem servir como biomarcadores para uma variedade de exposições a produtos químicos, incluindo as substâncias químicas presentes no ambiente aquático. Assim, as medidas de stresse oxidativo têm sido utilizadas como indicadores sensíveis de alerta precoce de efeitos adversos nos compartimentos aquáticos contaminados num elevado número de situações e organismos vivos (Livingstone, 2001).

Avaliaram-se os efeitos de compostos farmacêuticos amplamente utilizados e de um detergente ao nível de biomarcadores de stresse oxidativo no crustáceo *Artemia parthenogenetica* e no peixe *Gambusia holbrooki*, após a exposição aguda a estes compostos (Nunes et al., 2006;2008). Utilizou-os para avaliar os efeitos do cádmio em tecidos de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* (Almeida et al., 2002) , ou para avaliar os efeitos do mercúrio no salmão, *Salmo salar* (Berntssen, 2003). Utilizaram-se estes biomarcadores para avaliar os efeitos de misturas complexas nos tecidos dos peixes *Wallaga attu* e *Catostomus commersoni*, respectivamente (Pandey et al., 2003; Oakes e Van der oast, 2003).

De uma forma geral, os resíduos de compostos farmacêuticos que são persistentes no ambiente aquático podem estimular a produção de ROS e resultar em dano oxidativo em organismos como os peixes, tal como foi verificado em alguns estudos efectuados com diazepam (Nunes et al., 2008), e carbamazepina (Li et al., 2010 a,b c; 2011). Estes fármacos, tal como muitos outros, são compostos persistentes e classificados como potencialmente perigosos para os organismos, porque a maioria dos efeitos resultantes de exposições agudas reportados para eles é inferior a 100 mg/L (Fent et al., 2006).

2.2 Biomarcadores Histopatológicos

Hoje em dia assume-se que as alterações estruturais observadas em diversas células, tecidos e órgãos são importantes como indicadores gerais de saúde dos peixes, e um reflexo dos efeitos da exposição a vários poluentes antropogénicos. A histopatologia é indispensável para efectuar uma avaliação adequada do equilíbrio dos ecossistemas aquáticos e tem sido cada vez mais utilizada em programas de monitorização ambiental, nomeadamente envolvendo peixes (Matos et al., 2007; Fernandes et al., 2008; Costa et al., 2009).

Uma das grandes vantagens do uso de biomarcadores histopatológicos na monitorização ambiental é o facto de estes permitirem examinar órgãos-alvo específicos, nomeadamente as brânquias e o fígado de peixes (Handy et al., 2002; Cengiz e Unlu, 2006). A investigação histológica dos órgãos de peixes, nomeadamente o fígado, demonstrou ser uma ferramenta extremamente sensível para revelar os processos adaptativos e os efeitos prejudiciais nos animais induzidos por contaminantes. Uma das principais razões porque o fígado é usado, é o facto de este ser um local onde ocorre a acumulação, biotransformação e excreção de inúmeros compostos. Na presença de contaminação o fígado pode desenvolver alterações funcionais e estruturais que podem levar ao comprometimento das funções hepáticas com consequências negativas na saúde, crescimento e reprodução dos indivíduos (Koehler, 2004; Cengiz et al., 2006; Carola et al., 2009). As brânquias são também usadas pois são o primeiro local de contacto com os xenobióticos no organismo uma vez que a função delas é realizar as trocas gasosas entre o sangue e a água. Quando existem perturbações no funcionamento das brânquias provocadas pela exposição continuada a xenobióticos, estas podem de certa forma comprometer a saúde do indivíduo, e até mesmo ter implicações na sua vida, pela diminuição da eficácia respiratória (Leonardo et al., 2001; Cengiz et al., 2006).

As alterações histológicas aparecem usualmente como uma resposta aos efeitos sub-letais, sendo um método eficaz para detetar os efeitos perniciosos em vários tecidos e órgãos, decorrentes sobretudo de exposições crónicas a determinados xenobióticos (Bernet et al., 1999). Alterações a nível celular e na função de órgãos importantes são os primeiros indícios de uma má adaptação a perturbações externas no indivíduo que pode eventualmente levar a problemas de saúde e posteriormente à sua morte (Short e Meyers, 2001). Apesar da ausência frequente de dados numéricos que torna muito complicado

estabelecer relações de causa-efeito entre patologia e graus de contaminação, é sempre possível avaliar a significância dos dados obtidos por via quantitativa (Schwaiger et al., 1997).

Os biomarcadores histopatológicos podem ser vantajosos, uma vez que é relativamente fácil a recolha de amostras e posterior processamento, sendo que a sua utilização permite avaliar vários sistemas celulares num mesmo organismo. Esta técnica é ainda importante porque permite detetar e identificar os locais específicos de lesões celulares (Handy et al., 2002).

Por outro lado, é difícil determinar qual o peso biológico real de cada lesão nos indivíduos, ou seja, de que forma determinadas lesões comprometem, mais ou menos, a saúde dos indivíduos (Costa et al., 2009). Nesse sentido, podem ser aplicados índices de condição que indicam a importância relativa de lesões, pois desde logo algumas lesões implicam mais prejuízo para um órgão do que outras. Assim, foram criados índices ponderados, onde é atribuído um valor a uma lesão específica de acordo com o seu real impacto nos organismos (Bernet et al., 1999).

2.3 Biomarcadores Genotóxicos

Muitos compostos xenobióticos ou os seus metabolitos apresentam propriedades genotóxicas, que lhes permitem induzir alterações no material genético. O uso de parâmetros genotóxicos, principalmente em organismos aquáticos permite avaliar o efeito dos poluentes no meio hídrico, bem como alterações do seu potencial tóxico ou genotóxico após interação com o ambiente. Alguns compostos podem formar uma ligação covalente ao DNA produzindo aductos (Dolcetti et al., 2002; Hellou et al., 2006), os quais podem ser responsáveis por mutações impedindo a replicação fidedigna do DNA ou desencadeando processos de reparação do mesmo, nem sempre efetivos (Maccubbin, 1994). Existem ainda outras alterações estruturais como quebras de cadeia de DNA, perdas de bases, hipometilação entre outras mutações que sugerem durante a exposição a compostos genotóxicos.

De entre as diferentes metodologias disponíveis para a avaliação de dano genético, a avaliação das quebras de cadeia de DNA conjuntamente com as anomalias

nucleares eritrocíticas (ANE) demonstraram elevada sensibilidade à exposição a compostos xenobióticos, fornecendo informações relativamente a danos moleculares (facilmente reparáveis – quebras de cadeia) e danos subcelulares (irreversíveis – anomalias) (Oliveira et al., 2008).

A integridade do DNA, avaliada pelo método de desenrolamento alcalino, demonstrou sensibilidade dos peixes a danos genotóxicos induzidos por compostos como HAPs (Maria et al., 2002), constituintes de efluentes da pasta de papel como ácidos resínicos e reteno (Maria et al., 2004a,b; 2005) e metais (Ahmad et al., 2006; Oliveira et al., 2008; Guilherme et al., 2008a). As ANE, por seu lado, têm assumido uma grande relevância devido à facilidade e rapidez de execução, sensibilidade, baixo custo e fiabilidade demonstrada em diferentes espécies de peixes expostos a metais (Ayllon e Garcia-Vazquez, 2000; Oliveira et al., 2008), HAPs (Gravato e Santos, 2002; Maria et al., 2002; Pacheco e Santos, 2002), e efluentes de uma refinaria de petróleo (Çavas e Ergene-Gözükara, 2005).

O DNA é um componente celular chave particularmente suscetível a lesões por ROS (Cerutti, 1985), as quais, na sua maioria, parecem ser mediadas pelo HO^\cdot . A heterogeneidade das moléculas de DNA permite o ataque de HO^\cdot a bases nucleicas e ao esqueleto de desoxirribose (Buxton et al., 1988). O radical HO^\cdot pode subtrair átomos de H da desoxirribose, podendo levar à libertação de bases purinas e pirimidinas e à formação de clivagens numa das cadeias do DNA (Halliwell e Gutteridge, 1999). As cisões nas cadeias simples podem ser reparadas através duma série de mecanismos. Pelo contrário, quando as duas cadeias são quebradas no mesmo local, forma-se uma cisão dupla que não pode ser adequadamente reparada.

Apesar do grande número de estudos sobre danos no DNA induzidos por compostos que geram stresse oxidativo em mamíferos, poucos estudos abordaram o dano oxidativo do DNA em peixes. A literatura disponível sugere que a ocorrência de dano oxidativo pode ser dependente da espécie (Charissou et al., 2004), realçando a necessidade de avaliar a sua aplicabilidade como biomarcador em peixes.

2.4 Biomarcadores de Biotransformação

O principal mecanismo para manter a homeostasia corporal durante a exposição de organismos a moléculas estranhas, tais como os fármacos, é a biotransformação de xenobióticos. Normalmente, a biotransformação de xenobióticos é realizada por um número limitado de enzimas com ampla especificidade para substratos. Uma consequência importante da biotransformação é a alteração das propriedades físicas de um xenobiótico que favorecem a sua absorção (lipofília), de modo a passarem a possuir características que favoreçam a sua excreção, nomeadamente por aumento da hidrossolubilidade (Klaassen, 2001; Newman, 2001).

As reacções catalisadas por enzimas de biotransformação de xenobióticos são geralmente divididas em três classes, denominados de fase I, fase II e fase III. As reacções de fase I envolvem a hidrólise, redução e oxidação do composto estranho. Estas reacções expõem ou introduzem um grupo funcional (-OH,-NH₂,-SH ou -COOH) e, geralmente, resultam em apenas um pequeno aumento na hidrossolubilidade (Walker et al., 2001; Newman, 2001; Fontáinhas-Fernandes, 2005). Por outro lado, as reacções de biotransformação de fase II incluem a glucuronidação, a sulfatação, a acetilação, a metilação, a conjugação com glutathione (síntese de ácido mercaptúrico), e a conjugação com aminoácidos (como a glicina, taurina e ácido glutâmico) (Klaassen, 2001; Newman, 2001). A maioria das reacções da fase II de biotransformação resulta num grande aumento na hidrossolubilidade dos xenobióticos e, conseqüentemente, promovem bastante a excreção de substâncias químicas externas (Klaassen, 2001; Walker et al., 2001). Por último, as enzimas de fase III (por exemplo, peptidases, hidrolases e biliases) catalisam o catabolismo dos metabolitos conjugados, com o objectivo de formar produtos excretáveis (van der Oost et al., 2003; Fontáinhas-Fernandes, 2005).

De uma forma geral, as diversas substâncias estranhas aos organismos seguem o processo de biotransformação de acordo com o modo sequencial referido, embora possam existir exceções. As isoenzimas glutathione S-transferases (GST) são uma das principais enzimas de destoxificação de xenobióticos da Fase II, pertencendo a uma família de enzimas multifuncionais envolvidas na catálise do ataque nucleofílico do átomo de enxofre da glutathione (g-glutamyl-cisteinilglicina) para um grupo eletrofílico em produtos metabólicos ou compostos xenobióticos (Blanchette et al., 2007), podendo desta forma minimizar a toxicidade destes últimos. Esta enzima de biotransformação é

aplicada como biomarcador ao nível de estudos com peixes para a avaliação de efeitos de substâncias químicas.

Alguns exemplos incluem estudos da avaliação dos efeitos de fármacos amplamente usados (diazepam, clofibrato e ácido clorifibrato) e um detergente (SDS) em *Gambusia holbrooki* (Nunes et al., 2008), a avaliação das respostas bioquímicas no músculo de *Salmo salar* após a exposição a etinilestradiol e tribultilestanho (Greco et al., 2007), e a avaliação dos efeitos subcrónicos de dipirona em *Rhamdia quelen* (Pamplona et al., 2011).

2.5 Biomarcadores de Neurotoxicidade

Um dos biomarcadores mais utilizados, na monitorização ambiental, é a medição da inibição da acetilcolinesterase (AChE), isto porque muitos contaminantes têm como alvo o sistema nervoso central, provocando perturbações a nível da transmissão do impulso nervoso na placa motora (Nunes et al., 2004; Rodrigues et al., 2011).

A inibição da AChE é utilizada como indicativo de exposição a compostos anticolinesterásicos, nomeadamente pesticidas das classes dos organofosforados e dos carbamatos (Sancho et al., 2000) e alguns metais (Diamantino et al., 2003). Esta enzima pode ser encontrada no cérebro e também na junção neuromuscular de vertebrados, tendo um papel fundamental no controlo da acumulação de um mediador químico essencial na transmissão do impulso nervosa, a acetilcolina. AChE é responsável pela hidrólise do neurotransmissor acetilcolina em ácido acético e colina (Ellman et al., 1961). Esta regulação impede a hiperestimulação dos recetores da acetilcolina, que por sua vez é essencial para o bom funcionamento dos sistemas sensoriais e neuromusculares (Rodrigues et al., 2011). A inibição da AChE, provocada por alguns agentes tóxicos, resulta na acumulação de acetilcolina em sinapses nervosas que originam perturbações das funções nervosas, podendo levar à morte do organismo (Monteiro et al., 2005).

IV CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ao longo dos últimos anos foi observado um acréscimo significativo no consumo de medicamentos no Mundo e em Portugal. Os medicamentos uma vez utilizados pelo homem são submetidos a um processo que começa na sua absorção e acaba na eliminação através da urina e fezes (maioritariamente), podendo originar compostos sob a forma inalterada ou sob a forma de metabolitos. São estes resíduos que escapam aos processos de depuração das ETARs convencionais, ou são diretamente descartados no ambiente, e surgem nos recursos hídricos, expondo os organismos aquáticos constantemente. O modo mais eficaz de evitar, ou pelo menos, de minimizar ao máximo o impacte ambiental e para a saúde humana dos resíduos medicamentosos e químicos, é evitar o seu descarte no ambiente. É fundamental dar a conhecer cada vez mais a toda a população a importância da correta utilização de medicamentos.

Existe ainda a necessidade de se desenvolver mais estudos nessa área para se compreender melhor qual o grau do impacte dos fármacos no ambiente. Há necessidade de identificar os fármacos nos compartimentos ambientais (águas e solos), desenvolvendo e validando métodos cada vez mais precisos e exatos para deteção, procurando também uma compreensão melhor sobre os mecanismos de interação das drogas e/ou misturas das mesmas entre si e com os organismos, populações e comunidades nos ecossistemas, procurando desenvolver mecanismos eficazes para aumentar a sua biodegradabilidade e minorar a ecotoxicidade e impacte na saúde humana.

A avaliação dos potenciais efeitos de compostos farmacêuticos em organismos não-alvo em ambientes contaminados é algo que merece atenção, pois apesar da gama a que eles se encontram no ambiente ser baixa, variando de ng/L a µg/L, é suficiente para induzir efeitos tóxicos sub-letais ao nível dos organismos.

V REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Ågerstrand, A. et al (2011). *Reporting and evaluation criteria as means towards a transparent use of ecotoxicity data for environmental risk assessment of pharmaceuticals*. Environmental Pollution. Vol.159, pp. 2487-2492
- Ahmad, I., et al (2006). *Oxidative stress and genotoxic effects in gill and kidney of Anguilla anguilla L. exposed to chromium with or without preexposure to [beta]-naphthoflavone*. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis 608, pp. 16-28.
- Almeida, P.R.,(2003). *Feeding ecology of Liza ramada (Risso, 1810) (Pisces, Mugilidae) in a south-western estuary of Portugal*. Estuarine Coastal and Shelf Science 57, pp. 313-323.
- Amorim, L.C.A. (2003). *Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais*. Rev. Bras. Epidemiol. Vol. 6, supl. 1
- Angelina D. et al (2013). *Contribution of hospital effluents to the load of pharmaceuticals in urban wastewaters: Identification of ecologically relevant pharmaceuticals*. Science of the Total Environment. pp. 302–316
- Ayllon, F., Garcia-Vazquez, E.,(2000). *Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in European minnow Phoxinus phoxinus and mollie Poecilia latipinna: an assessment of the fish micronucleus test*. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis 467, pp. 177-186.
- Bainy, A.C.D (1993). *How to evaluate the safety chemical substances in aquatic environments*. Ciência e Cultura, Vol. 45, pp.10 –11.
- Bagnyukova, T.V., Vasylykiv, O.Y., Storey, e K.B., Lushchak, V.I. (2005). *Catalase inhibition by amino triazole induces oxidative stress in goldfish brain*. Brain Res, Vol.1052, pp. 180–186.
- Baquero, F., Martinez, J.L. e Canton, R. (2008). *Antibiotics and antibiotic resistance in water environments*. Current Opinion in Biotechnology, Vol, 19 (3), pp.260-265.
- Bengtsson, B. et al (2006) *.Environment and Pharmaceuticalls*. Apoteket AB. April.
- Bernet, D., Schmidt, H., Meier, W., Burkhardt-Holm, P. e Wahli, T. (1999). *Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution*. Journal of Fish Diseases, Vol. 22, pp. 25-34.
- Berntssen MHG, Aatland A, Handy RD (2003). *Chronic dietary mercury exposure causes oxidative stress, brain lesions, and altered behaviour in Atlantic salmon (Salmo salar) parr*. Aquat Toxicol, Vol.65 pp. 55-72.
- Bianchini, A.(2005). *Testes toxicológicos e biomarcadores: uma abordagem integrativa no âmbito do INCT-TA*. Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Toxicologia Aquática (INCT-TA). Universidade Federal do Rio Grande Instituto de Ciências Biológicas.
- Blanchette, B., Feng, X., e Singh, B. R. (2007). *Marine Glutathione S –Transferases*. Marine biotechnology Vol.9, pp. 513–542.
- Bound, J.P. e Voulvoulis, N. (2005). *Household disposal of pharmaceutical as apathway for aquatic contamination in the UK*. Environmental Health Perspectives, pp.1705-1711.

- Buxton, G.V., Greenstock, C.L., Helman, W.P., Ross, A.B., (1988). *Critical review of rate constants for reactions of hydrated electrons, hydrogen atoms and hydroxyl radicals in aqueous solutions*. Journal of Physical and Chemical Reference Data, Vol. 17, pp. 513-886.
- Brown, S.B. et al (2004). *Contaminant effects on the teleost fish thyroid*. Environmental Toxicology e Chemistry, Vol. 23(7), pp. 1680-1701.
- Carballa, M. et al (2007). *Influence of ozone pre-treatment on sludge anaerobic digestion: Removal of pharmaceutical and personal care products*. Chemosphere, Vol. 67, pp. 1444–1452.
- Carola, J., et al (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 Environmental Contamination Toxicology, Vol. 83, pp. 35-41.
- Carvalho, F. (2006, Outubro). *Impacto dos medicamentos no ambiente*. Mundo Farmacêutico, pp. 12-13.
- Çavas, T., Ergene-Gözükara, S.(2005). *Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in Oreochromis niloticus following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents*. Aquatic Toxicology, Vol. 74, pp. 264-271.
- Celiz, M., Tso, J. e Aga, D. (2009). *Pharmaceutical metabolites in the environment analytical challenges and ecological risks*. Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 28 (12), pp. 2473-2484.
- Cengiz, E.I. e Unlu, 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, Vol. 21, pp. 246-253-
- Cerutti, P.A. (1985). *Prooxidant states and tumor promotion*. Science, Vol. 227, pp. 375-381.
- Cirja, M. et al. (2008). *Factors affecting the elimination of organic micropollutants from wastewater in conventional treatment plants (CTP) and membrane bioreactors (MBR)*. Environmental Science and Biotechnology, Vol. 7, pp. 61-68.
- Charissou, A.M., Cossu-Leguille, C., Vasseur, P. (2004). *Relationship between two oxidative stress biomarkers, malondialdehyde and 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine, in the freshwater bivalve Unio tumidus*. Science of The Total Environment, Vol. 322, pp. 109-122.
- Cleuvers, M., (2003). *Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects*. Toxicology Letters, Vol. 142, pp. 185–194.
- Costa, P. M., et al (2009). *Histological biomarkers in liver and gills of juvenile Solea senegalensis exposed to contaminated estuarine sediments: a weighted indices approach*. Aquatic toxicology, Vol. 92, pp. 202-212.
- Crane, M., Watts, C. e Boucard, T. (2006). *Chronic aquatic environmental risks from exposure to human pharmaceuticals*. Science of the Total Environment, Vol.367 (1), pp.23-41.
- Davies, A. (1995). *Oxidative stress: the paradox of aerobic life*. Biochemical Society Symposium, Vol.61, pp. 1-31.
- De Lange, H. J. (2006). *Behavioural responses of Gammarus pulex (Crustacea, Amphipoda) to low concentrations of pharmaceuticals*. Aquatic Toxicology, Vol.78, pp. 209-216.

- Diamantino, T. C., Almeida, E., Soares, A.M.V.M. e Guilhermino, L. (2003). *Characterization of cholinesterases from Daphnia magna Straus and their inhibition by zinc*. Bulletin of Environmental Contamination Toxicology, Vol. 45, pp. 219-225-
- Dinkova-Kostova, A. T. e Talalay, P. (2000). *Persuasive evidence that quinone reductase type I (DT diaphorase) protects cells against the toxicity of electrophiles and reactive forms of oxygen*. Free Radical Biology and Medicine. Vol. 29, pp 231.
- Dordio, A. et al. (2009). *Toxicity and removal efficiency of pharmaceutical metabolite clofibrilic acid by Typha spp. – Potential use for phytoremediation*. Bioresource Technology, Vol.100, pp. 1156–1161.
- Dolcetti, L., Dalla Zuanna, L., Venier, P. (2002). *DNA adducts in mussels and fish exposed to bulky genotoxic compounds*. Marine Environmental Research, Vol. 54, pp. 481-486.
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V. e Featherstone, R. M. (1961). *A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity*. Biochemical Pharmacology, Vol. 7, pp. 88-95.
- Fent, K., Weston, A. A., e Caminada, D. (2006) *Ecotoxicology of human pharmaceuticals*. Aquatic toxicology, Vol. 76, pp. 122–159.
- Fick, J. et al (2010). *Predicted critical environmental concentrations for 500 pharmaceuticals*. Regulatory Toxicology and Pharmacology, Vol.58, pp. 516-523.
- Filho, A.K.K. (2006). *Uso de biomarcadores de contaminação ambiental na avaliação do impacto do vazamento de óleo derivado de petróleo em ecossistemas de água doce*. Programa de Pós- Graduação em Ecologia e Conservação, Área de Concentração: Ecotoxicologia, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. CURITIBA.
- Folmar, L. C. et al (2000). *Induction of zona radiata and vitellogenin genes in estradiol and nonylphenol exposed male sheepshead minnows (Cyprinodon variegatus)*. Aquatic Toxicology. 49, 77.
- Fontainhas-Fernandes, A. (2005). *The use of biomarkers in aquatic toxicology studies*, Revista Portuguesa de Zootecnia, Vol. 1, pp. 67-86.
- Freire, M. et al. (2008). *Biomarcadores na avaliação da saúde ambiental dos ecossistemas aquáticos*. O. ecol, Bras., Vol.12(3), pp.347-354.
- Guilherme, S., Válega, M., Pereira, M.E., Santos, M.A., Pacheco, M., (2008). *Erythrocytic nuclear abnormalities in wild and caged fish (Liza aurata) along an environmental mercury contamination gradient*. Ecotoxicology and Environmental Safety, Vol. 70, pp. 411-421.
- Gravato, C., Santos, M.A., (2002). *Juvenile sea bass liver P450, EROD induction, and erythrocytic genotoxic responses to PAH and PAH-like compounds*. Ecotoxicology and Environmental Safety, Vol. 51, pp. 115-127.
- Greco, L., Capri, E., e Rustad, T. (2007) *Biochemical responses in Salmo salar muscle following exposure to ethynylestradiol and tributyltin*, Chemosphere, Vol. 68, pp. 564–571.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (1989). Free Radicals in Biology and Medicine. 3ª Edição. Oxford. Oxford University Press. pp 936.

- Handy, R. D., Runnalls, T. e Russell, O. M. (2002). *Histopathologic biomarkers in three spined sticklebacks *Gasterosteus aculeatus*, from several rivers in Southern England that meet the Freshwater Fisheries Directive*. *Ecotoxicology*, Vol.11, pp. 467-479.
- Heberer, T. (2002). *Ocurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data*. *Toxicology Letters*. May 10;131(1-2):5-17
- Hellou, J., Leonard, J., Collier, T.K., Ariese, F. (2006). *Assessing PAH exposure in feral finfish from the Northwest Atlantic*. *Marine Pollution Bulletin*, Vol. 52, pp. 433-441.
- Hernando, M. D. et al (2006). *Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments*, *Talanta*, Vol. 69,pp. 334–342.
- Jones, O.A., Voulvoulis, N. e Lester, J.N. (2003). *Potencial impact of pharmaceuticals on environmental health*. *Bulletin of the World Health Organization*, Vol. 81 (10), pp. 768-769.
- Jones, O.A.H., Voulvoulis, N., Lester, J.N. (2002). *Aquatic environmental assessment of the top 25 English prescription pharmaceuticals*. *Water Research*, Vol. 36, pp. 5013–5022
- Jonsson, C.M., Castro, V.L.(2005). *Bioindicadores e biomarcador de agroquímico no contexto da relação saúde-ambiente*. Embrapa, meio ambiente. Jaguariúna.
- Jung, J.H., Addison, R.F. e Shim, W.J. (2007). *Characterization of cholinesterase in marbled sole, *Limanda yokohamae*, and their inhibition in vitro by the fungicide iprobenfos*. *Marine Environmental Research*, Vol. 63(5), pp.471-478.
- Kim, S. e Aga, D.S. (2007). *Potencial ecological e human health impacts of antibiotics, antibiotic-resistant bacteria from wastewater treatment plants*. *Journal of Toxicology e Environmental Health*, Vol.10 (8), pp. 559-573.
- Klaassen C.D. (2001). *Toxicology: The Basic Science of Poisons*. 6th Edition. McGraw-Hill, pp.133-224.
- Koehler, A. (2004). *The gender-specific risk to liver toxicity and cancer of flounder (*Platichthys flesus* (L.)) at the German Wadden Sea coast*. *Aquatic Toxicology*, Vol. 70, pp. 36-60.
- Kummerer, K. (2009). *The presence of pharmaceutical in the environment due to human use - present knowledge and future challenges*. *Journal of Environmental Management*. Vol 90,pp. 2354-2366.
- Kummerer, K.. (2001). *Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources—a review*. *Chemosphere*, Vol. 45, pp. 957–969.
- Laville, N. et al (2004). *Effects of human pharmaceuticals on cytotoxicity, EROD activity and ROS production in fish hepatocytes*, *Toxicology*, Vol. 196, pp. 41–55.
- Leonardo, J. M. L. O., et al (2001). *Histologia das brânquias de larvas da tilápia do Nilo de origem tailandesa, submetidas a diferentes níveis de vitamina C*. *Acta Scientiarum*, Vol. 23, pp. 863-870.
- Li, Z. H., Li, P., e Randak, T. (2010a) *Effect of human pharmaceutical carbamazepine on antioxidant responses in brain of a model teleost in vitro: an efficient approach to biomonitoring*, *Journal of Applied Toxicology*, Vol. 30, pp. 644-648.

- Li, Z. H., Li, P., Rodina, M., e Randak, T. (2010b) *Effect of human pharmaceutical Carbamazepine on the quality parameters and oxidative stress in common carp (Cyprinus carpio L.) spermatozoa*. Chemosphere, Vol. 80, pp. 530–534.
- Li, Z. H., Zlabek, V., Velisek, J., Grabic, R., Machova, J., e Randak, T. (2010c) *Modulation of antioxidant defence system in brain of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) after chronic carbamazepine treatment*. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, Vol 151, pp.137–141.
- Li, Z. H., Zlabek, V., Velisek, J., Grabic, R., Machova, J., Kolarova, J., Li, P., e Randak, T. (2011) *Acute toxicity of carbamazepine to juvenile rainbow trout (Oncorhynchus mykiss): Effects on antioxidant responses, hematological parameters and hepatic EROD*. Ecotoxicology and Environmental Safety, Vol. 74, pp. 319-327
- Limón-Pacheco, J., e Gonsebatt, M. E. (2009). *The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress*. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol.674,pp. 137–147.
- Livingstone, R. (1991). *Organic xenobiotic metabolism in marine invertebrates*. Comparative Biochemistry and Physiology, Vol.. 7,pp. 5-185.
- Lushchak, V. I. (2011) *Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals*. Aquatic Toxicology, Vol. 101,pp. 13–30.
- Losso, C., Ghirardini, A.V. (2009). *Overview of ecotoxicological studies performed in the Venice Lagoon (Italy)*. Environment International In Press, Corrected Proof.
- Matos, P., et al (2007). *Biochemical and histological hepatic changes of Nile tilapia Oreochromis niloticus exposed to carbaryl*. Pesticide Biochemistry and Physiology, Vol. 89, pp. 73-80.
- Maria, V.L., Correia, A.C., Santos, M.A. (2002). *Anguilla anguilla L. biochemical and genotoxic responses to benzo[a]pyrene*. Ecotoxicology and Environmental Safety, Vol. 53, pp. 86-92.
- Maria, V.L., Correia, A.C., Santos, M.A.,(2004a). *Anguilla anguilla L. genotoxic and liver biotransformation responses to abietic acid exposure*. Ecotoxicology and Environmental Safety, Vol.58,pp. 202-210.
- Maria, V.L., Correia, A.C., Santos, M.A., (2004b). *Genotoxic and liver biotransformation responses in Anguilla anguilla L. after exposure to dehydroabietic acid*. Fresenius Environmental Bulletin, Vol.13,pp. 56-65.
- Maria, V.L., Correia, A.C., Santos, M.A.,(2005). *Anguilla anguilla L. liver EROD induction and genotoxic responses after retene exposure*. Ecotoxicology and Environmental Safety, Vol. 61,pp. 230- 238.
- Maria, V.L. et al (2009). *Wild juvenile Dicentrarchus labrax L. liver antioxidant and damage responses at Aveiro Lagoon, Portugal*. Ecotoxicology and Environmental Safety, Vol. 72, pp. 1861-1870.
- Martins, L.R.R. (2009). *Monitoramento ambiental e o uso de biomarcadores*. Universidade Tecnológica Federal do Paraná Departamento Acadêmico de Química e Biologia.

- Maccubbin, A.E., (1994). *DNA adduct analysis in fish: Laboratory and field studies*. In: Malins, D.C., Ostrander, G.K. (Eds.). *Aquatic toxicology: Molecular, biochemical and cellular perspectives*. CRC Press Boca Raton, FL, pp. 267–294.
- McCarthy, F., Halbrook, R., Shugart, R. (1991). *Conceptual strategy for desing, implementation, and validation of a biomarker based biomonitoring capability*. Environmental Sciences Division, Oak Ridge National Laboratory, Tennessee,USA.
- Mckeon, D. M., Calabrese, J. P., Bissonnette, G. K. (1995). *Antibiotic-resistant gram-negative bacteria in rural groundwater supplies*. Water Research, Vol. 29, pp. 1902
- Melo, D., Ribeiro, E. e Storpirtis, S. (2006). *A importancia e a historia dos estudos de utilizaçao de medicamentos*. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol.42(4), pp.475-485.
- Monserrat, J.M. (2007). *Pollution biomarkers in estuarine animals: critical review and new perspectives*. Comparative Biochemistry and Physiology part C: Toxicology and Phamacology, Vol.146(1-2), pp. 221-34.
- Monteiro, M.S.S.C.A. (2003). *Avaliação da toxicidade de contaminantes ambientais em populações naturais de Pomatoschistus microps*. Universidade de Aveiro. Departamento de Biologia.
- Monteiro, M., Quintaneiro, C., Morgado, F., Soares, A. M. V. M. e Guilhermino, L. (2005). *Characterization of the cholinesterases present in head tissues oh the estuarine fish Pomatoschistus microps: application to biomonitoring*. Ecotoxicology and Environmental Safety, Vol. 62, pp. 341-347.
- Newman, N.C. (2001) *Fundamentals of Ecotoxicology*. Lewis Publishers
- Nicholson, S., LAM, P.K. (2005). *Pollution monitoring in Southeast Asia using biomarkers in the mytilid mussel Perna viridis (Mytilidae: Bivalvia)*. Enviromment International, Vol. 31(1), pp. 121-132.
- Nunes, B., Carvalho, F., e 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, Vol. 57, pp. 1581–1589.
- Nunes, B. (2007) *Pharmaceutical Drugs in the Environment: Change of the Paradigm*. Revista da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Fernando Pessoa, Vol. 3,pp. 90-103.
- Nunes, B. et al (2008). *Behaviour and biomarkers of oxidative stress in Gambusia holbrooki after acute exposure to widely used pharmaceuticals and a detergent*, Ecotoxicology and environmental safety, Vol. 71,pp. 341–354.
- Oakes, K. D., e Van Der Kraak, G. J. (2003). *Utility of the TBARS assay in detecting oxidative stress in white sucker (Catostomus commersoni) populations exposed to pulp mill effluent*. Aquatic Toxicology, Vol. 63, pp. 447–463.
- Odum, Eugene P. (2004). *Fundamentos da Ecologia*. 7ªed. Fundação Calouste Gulbenkian.Lisboa. pp. 354-366
- Oggier, D. M. et al (2010). *Effects of Diazepam on Gene Expression and Link to Physiological Effects in Different Life Stages in Zebrafish Danio rerio*. Environmental science & technology.

- Oliveira, M., Serafim, A., Bebianno, M.J., Pacheco, M., Santos, M.A.(2008). *European eel (Anguilla anguilla L.) metallothionein, endocrine, metabolic and genotoxic responses to copper exposure*. Ecotoxicology and Environmental Safety, Vol. 70,pp. 20-26.
- Pacheco, M., Santos, M.A., (2002). *Naphthalene and beta-naphthoflavone effects on Anguilla anguilla L. hepatic metabolism and erythrocytic nuclear abnormalities*. Environment International, Vol. 28,pp. 285-293.
- Pamplona, J. H. et al (2011) *Subchronic effects of dipyrone on the fish species Rhamdia quelen*, Ecotoxicology and Environmental Safety, Vol 74, pp. 342–349.
- Pandey S, Parvez S, Sayeed I, Haque R, Bin-Hafeez B, Raisuddin S. (2003). *Biomarkers of oxidative stress: a comparative study of river Yamuna fish Wallago attu (Bl. & Schn.)*. Sci Total Environ., Vol. 309, pp. 105-115.
- Paul, K.S. e John , S. (2003). *The use of biomarkers in environmental monitoring programmes*. Elsevier Marine Pollution Bulletin Vol.46, , pp 182–186
- Peakall, D. (1992). *Animal biomarkers as pollution indicators*. Chapman & Hall, London.
- Porto, J.I.R., Araujo, C.S.O. e Felberg E. (2005). *Mutagenic effects of mercury pollution as revealed by micronucleus test on three Amazonian fish species*. Environmental Research, Vol.97, pp. 287-292.
- Rank, J., Lehtonen, K.K., Strand, J. e Laursen, M. (2007). *DNA damage, acetylcholinesterase activity and lysosomal stability in native and transplanted mussels (Mytilus edulis) in areas close to coastal chemical dumping sites in Denmark*. Aquatic Toxicology, Vol.84(1), pp.50-61.
- Regoli F. et al (2002). *Oxidative Stress in ecotoxicology from the analysis of individual antioxidants to a more integrated approach*. Marine Environmental Research, Vol. 54, pp. 419-423
- Rodrigues, S. R. et al (2011). *Cholinesterase (ChE) inhibition in pumpkinseed (Lepomis gibbosus) as environmental biomarker: ChE characterization and potential neurotoxic effects of xenobiotics*. Pesticide Biochemistry and Physiology, Vol. 99, pp.181-188.
- Rüdiger, H.W. (1999). *Biomonitoring in occupational medicine*. In: Marquart H, Schäfer SG, McClellan R, Welsch F (eds.). Toxicology. San Diego: Academic Press, pp.1027-39.
- Sancho, E. et al (2000). *Alterations on AChE activity of yhe fish Anguilla Anguilla as response to herbice-contaminated water*. Ecotoxicology and Environmental Safety, Vol. 46, pp 57-63.
- Santos L. et al (2009). *Ecotoxixological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environmental*. Journal of Hazardous Materials. Vol 175, pp. 45-95.
- Sarkar, A. et al. (2006). *Molecular Biomarkers: their significance and application in marine pollution monitoring*. Ecotoxocology, Vol. 15(4), pp. 333-340. Schwaiger, J., et al (1997). *The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish*. Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery, Vol. 6, pp. 75-86.
- Schrap, S. M. et al (2003) *Humane en veterinaire geneesmiddelen in Nederlands oppervlaktewater en afvalwater*. Lelystad: RIZA.
- Short, S. e Meyers, T.R. (2001). Chapter 13 histology for finfish. NWFHS Laboratory Procedures Manual – Version 1.0.

- Simon D., John M., John B. (2005). *Ecosystem response to antibiotics entering the aquatic environment*. Marine Pollution Bulletin, Vol. 5, pp. 218–223.
- Sires, I. et al (2007). *Degradation of clofibric acid in acidic aqueous medium by electro-Fenton and photoelectro-Fenton*. Chemosphere., Vol.66, pp.1660–1669.
- Sonnenschein, C., Soto A M. (1998). *An updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists*. Steroid Biochem.Mol.Biol, Vol.65, pp.143-50.
- Sonnenschein, C., Soto A M. (1998). *An updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists*. Steroid Biochem.Mol.Biol, Vol.65, pp143-50
- Stefanoni, M.F., Abessa, D.M.S. (2008). *Lysosomal Membrane Stability of the brown mussel Perna perna (Linnacus) (Mollusca, Bivalvia) exposed to the anionic surfactant Linear Alkylbenzene Sulphonate (LAS)*. Pan-American Journal of Aquatic Sciences, Vol.3(1), pp.6-9.
- Stegeman, J.J. et al. *Molecular Responses to Environmental Contamination: Enzyme and Protein Systems as Indicators of Chemical Exposure and Effect*. In: HUGGETT, R.J., KIMERLY, R.A., MEHRLE JR., P.M., BERGMAN, H.L. (Eds.) Biomarkers: Biochemical, Physiological, and Histological Markers of Anthropogenic Stress, Lewis Publishers, Chelsea, MI, USA, 1992
- Timbrell, A. (1998). *Biomarkers in toxicology*. Toxicology, Vol. 129, pp. 1-12.
- Urase, T., Kagawa, C. e Kikuta, T. (2005). *Factors affecting removal of pharmaceutical substances and estrogens in membrane separation bioreactors*. Desalination, Vol. 178, pp.107–113.
- van der Oost, R. V. D., Beyer, J., e Vermeulen, N. P. E. (2003). *Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review*. Environmental Toxicology and Pharmacology, Vol. 13, pp. 57–149.
- Verlicchi P. et al (2010). *Hospital effluents as a source of emerging pollutants: an overview of micropollutants and sustainable treatment options*. J Hydrol, Vol.389, pp.416-28.
- Viarengo, A. et al. (2007). *The use of biomarkers in biomonitoring: a 2-tie approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms*. Comparative Biochemistry and Physiology part C: Toxicology and Pharmacology, Vol 146(3), pp.281-300
- Walker C.H. et al (2001). *Principles of Ecotoxicology*. Second Edition. Library of Congress Cataloging in Publication Data, pp. 59-89 e163-178.
- Walker, C.H. et al (2001). *Principles of Ecotoxicology*. Second Edition. Taylor & Francis. pp 141 –145.
- Weihai X. (2007). *Occurrence and elimination of antibiotics at four sewage treatment plants in the Pearl River Delta (PRD), South China*. Water Res., Vol. 41(19), pp.4526-34.
- World Health Organization (1996). *Biological Monitoring of Chemical Exposure in the Workplace*. Vol. 1 e 2. Geneva..
- Zhang, X. C. et al (2003) *Reactive oxygen species and extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogenactivated protein kinase mediate hyperoxia-induced cell death in lung epithelium*. American journal of respiratory cell and molecular biology, Vol 28, pp. 305–315.